



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS DE  
AMARANTO**

**EFFECTOS INMUNOMODULATORIOS**

---

***Tesista: Bioq. Julián Moronta***

***Director: Dr. Guillermo H. Docena***

***Codirectora: Dra. María Cristina Añón***

***Año 2015***

El presente trabajo, para optar por el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) (CONICET-CCT La Plata, UNLP, La Plata, Argentina) bajo la dirección del Dr. Guillermo H. Docena y la codirección de la Dra. María Cristina Añón.



# *Agradecimientos*

---

*A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por la formación profesional.*

*A CONICET por financiar los trabajos de investigación.*

*A mis directores Dr. Guillermo H. Docena y Dra. María Cristina Añón, por su experiencia y guía en la realización del presente trabajo.*

*Al personal directivo, técnico y administrativo del CIDCA por la asistencia brindada.*

*A la Dra. Yanina Hiriart por el suministro de la flagelina.*

*A Paulita Aphalo por su aporte incondicional al conocimiento.*

*A todos mis compañeros de laboratorio por compartir conocimientos y ratos de diversión.*

*A Aldo Campana por su calidez humana y su claridad en la resolución de los enigmas.  
¡Siempre enfocado en la eliminación de variables!*

*Al “Dream Team” por los momentos de reflexión, alegría y sueños compartidos: Anita, Ceci, Charlie, Cristian y Nachito.*

*A mi familia por el apoyo incondicional.*

*A mi novia Juli por creer siempre en mí.*

*A mis amigos, por hacerme recordar que la esencia no se pierde en el difícil transitar.*



# *Índice general*

---

# Índice de contenidos

---

<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
 <b>HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	 <b>7</b>
Hipótesis de trabajo	8
Objetivos específicos	8
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	 <b>10</b>
<b>1. PREPARACIÓN DE AISLADO E HIDROLIZADOS DE AMARANTO</b>	<b>11</b>
1.1 Obtención de las semillas de Amaranto	11
1.2 Obtención de la harina de Amaranto	11
1.3 Preparación del aislado proteico (AI)	11
1.4 Preparación de los hidrolizados proteicos (AH)	12
<b>2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS</b>	<b>12</b>
2.1 Determinación del contenido de humedad y cenizas	12
2.2 Determinación del grado de hidrólisis (%Gh)	13
2.3 Determinación de la temperatura ( $T_d$ ) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ )	14
2.4 Determinación del contenido proteico	15
2.4.1 Proteína total por el método Kjeldahl	15
2.4.2 Proteína total por el método Micro-Kjeldahl	15
2.4.3 Proteína soluble por el método de Lowry	16
2.5 Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)	16
2.5.1 Equipo RP-HPLC	16
2.5.2 Técnica cromatográfica	17
2.5.3 Obtención de los Segmentos hidrofílicos, intermedios e hidrofóbicos	18
2.5.4 Obtención de las muestras M1-M80	19

2.5.5	Obtención de muestras F1-F15	19
<b>2.6</b>	<b>Electroforesis</b>	<b>19</b>
2.6.1	Tricina SDS-PAGE	20
2.6.2	Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras	21
2.6.3	Técnica empleada	22
2.6.3.1	Preparación de las muestras	22
2.6.3.2	Buffers	22
2.6.3.3	Desarrollo de corrida	22
2.6.3.4	Fijación, coloración y decoloración	23
2.6.3.5	Obtención de las imágenes y análisis de los geles	23
<b>2.7</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>SECUENCIACIÓN, ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y SÍNTESIS PEPTÍDICA</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Secuenciación peptídica por Nano cromatografía/ Espectrometría de masa (UHPLC/ESI-MS)</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Herramientas bioinformáticas</b>	<b>24</b>
3.2.1	Identificación por homología en el subreino plantas verdes	24
3.2.2	Determinación de la potencial actividad inmunomoduladora	25
3.2.3	Determinación de las secuencias peptídicas consensos	25
<b>3.3</b>	<b>Síntesis peptídica mediante técnica en fase sólida (SPPS)</b>	<b>26</b>
<b>4.</b>	<b>BUFFERS Y MEDIOS DE CULTIVO</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Buffer PBS</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>DMEM suplementado</b>	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>DMEM de Adhesión</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>LÍNEAS CELULARES</b>	<b>27</b>
<b>5.1</b>	<b>Caco-2</b>	<b>27</b>
<b>5.2</b>	<b>Caco-2 ccl20:luc</b>	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Crecimiento y recuento celular</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FLAGELINA (FLIC)</b>	<b>29</b>
<b>6.1</b>	<b>Obtención de FLiC</b>	<b>29</b>
<b>6.2</b>	<b>Detoxificación de FLiC</b>	<b>29</b>



<b>6.3</b>	<b>Determinación de LPS por test LAL</b>	<b>30</b>
<b>7.</b>	<b>CITOTOXICIDAD CELULAR</b>	<b>31</b>
7.1	Determinación de la actividad enzimática Lactato deshidrogenasa (LDH)	31
7.2	Determinación de la actividad enzimática oxidorreductasa (MTT)	32
7.3	Ensayo de absorción del colorante Rojo Neutro (RN)	34
<b>8.</b>	<b>TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE OLIGOPÉPTIDOS</b>	<b>35</b>
8.1	Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER)	35
8.2	Ensayo de transporte transepitelial peptídico	37
8.3	Determinación porcentual de los péptidos por RP-HPLC	38
<b>9.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA QUIMIOQUINA CCL20</b>	<b>38</b>
9.1	Dosaje de actividad enzimática luciferasa	39
9.2	Evaluación de la expresión de mRNA CCL20 por Real Time PCR (qPCR)	40
9.2.1	Extracción de RNA total	41
9.2.2	Retrotranscripción	42
9.2.3	Real Time PCR (qPCR)	42
9.3	Dosaje de CCL20 en sobrenadante celular por ELISA Indirecto	44
<b>10.</b>	<b>MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA</b>	<b>45</b>
10.1	Agente inmunógeno	46
10.2	Adyuvante mucosal	46
10.3	Agente inmunomodulador	46
10.4	Animales de laboratorio	46
10.5	Protocolo de modulación en modelo murino de alergia alimentaria a PLV	47
<b>11.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE. PRUEBAS <i>IN VIVO</i></b>	<b>49</b>
11.1	Signos clínicos post-desafío oral (DO)	49
11.2	Prueba cutánea en almohadilla plantar (PC)	50

<b>12. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE. PRUEBAS <i>IN VITRO</i></b>	<b>51</b>
<b>12.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral</b>	<b>51</b>
12.1.1 Determinación sérica de IgE específicos por EAST	51
12.1.2 Determinación sérica de IgG1 e IgG2a por ELISA Indirecto	52
<b>12.2 Evaluación de la respuesta inmune celular</b>	<b>53</b>
12.2.1 Dosaje de la expresión de mRNA CCL20 por qPCR	53
12.2.2 Dosaje de citoquinas IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$ por ELISA Indirecto	53
 <b>CAPÍTULO I: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MUESTRAL</b>	 <b>56</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>57</b>
<b>1.1 Proteínas de Amaranto</b>	<b>57</b>
<b>1.2 Grado de hidrólisis (%Gh)</b>	<b>59</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>2.1 Objetivo general</b>	<b>61</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	<b>61</b>
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Caracterización de las muestras AI, AH23 y AH30</b>	<b>62</b>
3.1.1 Obtención del aislado proteico	62
3.1.2 Obtención de hidrolizados proteicos a partir del aislado proteico	62
3.1.3 Determinación de humedad, cenizas y pH	63
3.1.4 Determinación del % de proteínas, solubilidad proteica y grado de hidrólisis	64
3.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	65
3.1.6 Determinación de la composición polipeptídica por electroforesis Tricina SDS-PAGE	66
3.1.6.1 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30 en condiciones reductoras	67
3.1.6.1.1 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30, en condiciones reductoras y en distintos solventes	68
3.1.6.2 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30, en condiciones no reductoras	69
<b>3.2 Caracterización de las muestras obtenidas por RP-HPLC</b>	<b>71</b>
3.2.1 Obtención de los Segmentos hidrofílicos, intermedio e hidrofóbico	71
3.2.2 Obtención de muestras M1-M80 a partir de AH30	74
3.2.3 Obtención de las muestras F1-F15 a partir de M1 y M2	76
<b>3.3 Secuenciación, análisis bioinformáticos y síntesis de péptidos</b>	<b>78</b>

3.3.1	Secuenciación peptídica de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 de M2	78
3.3.2	Determinación de secuencias homólogas en proteínas del subreino plantas verdes	81
3.3.3	Determinación de la potencial actividad inmunomoduladora	84
3.3.4	Determinación de secuencias consenso	86
3.3.5	Síntesis peptídica en fase sólida (SPPS)	87
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>89</b>
 <b><i>CAPÍTULO II: CAPACIDAD MODULATORIA DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA</i></b>		<b>92</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>93</b>
1.1	Capacidad inmunomoduladora <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de péptidos de amaranto	93
1.2	Transportador peptídico transepitelial PepT1	93
1.3	Flagelina como estimulador de la inmunidad innata	95
1.4	Receptor TLR5	96
1.5	Quimioquina CCL20	99
1.6	Línea reportera Caco-2 ccl20:luc	99
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>101</b>
2.1	Objetivo general	101
2.2	Objetivos específicos	101
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>102</b>
3.1	Obtención y caracterización de flagelina (FliC)	102
3.1.1	Obtención de FliC	102
3.1.2	Caracterización de FliC	102
3.2	Estudio de la capacidad moduladora de AI, AH23 y AH30	103
3.2.1	Inhibición dosis-respuesta de la actividad luciferasa	103
3.2.2	Efecto del pre-tratamiento en la modulación de la actividad luciferasa	104
3.2.3	Toxicidad celular por MTT, RN y LDH	105
3.3	Estudio de la capacidad moduladora de M1 y M2	107
3.3.1	Modulación de la actividad luciferasa por el Segmento Hidrofílico, Intermedio e Hidrofóbico	107

3.3.2	Modulación de la actividad luciferasa por M1-M80, provenientes de AH30	108
3.3.3	Modulación de la actividad luciferasa y citotoxicidad por las fracciones M1 y M2	109
<b>3.4</b>	<b>Estudio de la capacidad moduladora de los péptidos P2 y P3</b>	<b>111</b>
3.4.1	Modulación de la actividad luciferasa por las fracciones F1-F15	111
3.4.2	Modulación de la actividad luciferasa y citotoxicidad, de los péptidos P2 y P3	113
3.4.3	Modulación de la expresión de mRNA CCL20 por P2 y P3	115
3.4.4	Modulación de la síntesis CCL20 por P2 y P3	116
<b>3.5</b>	<b>Transporte transepitelial de oligopéptidos</b>	<b>118</b>
3.5.1	Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial	118
3.5.2	Medición del pasaje transepitelial de oligopéptidos	119
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>123</b>
 <b><i>CAPÍTULO III: MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA</i></b>		<b>126</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>127</b>
1.1	Hipersensibilidad	127
1.2	Alergia alimentaria	129
1.3	Generalidades de los mecanismos de Hipersensibilidad Tipo I	130
1.4	Manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria	135
1.5	Factores inmunológicos que regulan los mecanismos mediados por LTh1 y LTh2	137
1.6	Toxina colérica y proteínas de leche de vaca	140
1.7	Sistema inmune de la mucosa intestinal	141
1.8	Tolerancia oral	145
<b>2.</b>	<b>GENERALIDADES</b>	<b>148</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>149</b>
3.1	Objetivo general	149
3.2	Objetivos específicos	149
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>150</b>

<b>4.1</b>	<b>Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas <i>in vivo</i></b>	<b>150</b>
4.1.1	Signos clínicos post-desafío oral (DO)	150
4.1.2	Prueba cutánea en almohadilla plantar (PC)	151
<b>4.2</b>	<b>Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas <i>in vitro</i></b>	<b>153</b>
4.2.1	Evaluación de la respuesta inmune humoral	153
4.2.1.1	Niveles séricos de IgE	153
4.2.1.2	Niveles séricos de IgG1e IgG2a	154
4.2.2	Evaluación de la respuesta inmune celular	156
4.2.2.1	Expresión de mRNA de CCL20 por enterocitos	156
4.2.2.2	Secreción de citoquinas Th2 por esplenocitos	157
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>160</b>
	 <b><i>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES FINALES</i></b>	 <b>162</b>
	 <b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b>	 <b>168</b>

# Índice de figuras

---

FIGURA 1. REACCIÓN DE REDUCCIÓN DE MTT POR ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS .....	32
FIGURA 2. ESQUEMA ELÉCTRICO PARA LA MEDICIÓN DE LA RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSEPITELIAL (TER) .....	36
FIGURA 3. DESCRIPCIÓN DEL SISTEMA INSERTO-TRANSWELL .....	36
FIGURA 4. REACCIÓN DE BIOLUMINISCENCIA POR LA ENZIMA LUCIFERASA DE LUCIÉRNAGA .....	40
FIGURA 5. CURVA DE AMPLIFICACIÓN.QPCR .....	43
FIGURA 6. ESQUEMA GENERAL DEL MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA .....	48
FIGURA 7. TERMOGRAMAS DE DSC CORRESPONDIENTES PARA AI, AH23 Y AH30. ....	65
FIGURA 8. ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE CON 2-ME DE LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30. ....	68
FIGURA 9. . ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE CON 2-ME DE LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30 DISUELTAS EN H <sub>2</sub> O Y DMEM ADHESIÓN. ....	69
FIGURA 10. ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE DE LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30. .70	
FIGURA 11. CROMATOGRAFÍA RP-HPLC DE AI, AH23 Y AH30, A $\lambda$ =210 NM.....	72
FIGURA 12. CROMATOGRAFÍA RP-HPLC DE AI, AH23 Y AH30, A $\lambda$ =280 NM.....	73
FIGURA 13. ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE CON 2-ME DE LAS MUESTRAS M10, M32 Y M46. ....	75
FIGURA 14. ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE CON 2-ME DE LAS MUESTRAS M4, M19, M23, M24, M26 Y M49 .....	75
FIGURA 15. ELECTROFORESIS TRICINA SDS-PAGE CON 2-ME CON TINCIÓN DE AG DE LAS MUESTRAS M1, M2 Y M4 .....	76
FIGURA 16. CROMATOGRAFÍA RP-HPLC DE M1 Y M2 .....	77
FIGURA 17. CROMATOGRAMA A $\lambda$ = 210 Y 280 NM DE M2, CON TIMEPOS DE RETENCIÓN DE LAS FRACCIONES F6, F9, F12, F13 Y F14. ....	79
FIGURA 18. CROMATOGRAMA DE M2 A $\lambda$ =210 NM, CON MARCACIÓN DE LOS PICOS QUE CONFORMAN EL ESPECTRO .....	79

FIGURA 19. CROMATOGRAMA DE M2 A $\lambda=280$ NM. CON LA MARCACIÓN DE LOS PICOS QUE CONFORMAN EL ESPECTRO. ....	80
FIGURA 20. ALINEACIÓN DEL PÉPTIDO SSEDIKE DE LA FRACCIÓN F12 CON EL PÉPTIDO DE LA BASE DE DATOS BIOPEP DEL GRUPO G3. ....	85
FIGURA 21. SECUENCIAS CONSENSO A) SD(E/D)DADE Y B) DNDEE. ....	86
FIGURA 22. TRANSPORTADOR INTESTINAL DE OLIGOPÉPTIDOS PEPT1 .....	94
FIGURA 23. . ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL FLAGELO Y FILAMENTO FLAGELAR.....	96
FIGURA 24. VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR POR TLR. ....	98
FIGURA 25. ELECTROFORESIS TRICINE SDS-PAGE. EN LA MUESTRA FIC. ....	103
FIGURA 26. EFECTO DOSIS-RESPUESTA PARA LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30.. ....	104
FIGURA 27. EFECTO DE PRE-TRATAMIENTO CON AH30 SOBRE CACO-2 CCL20:LUC. ....	105
FIGURA 28. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR POR LAS TÉCNICAS DE MTT, RN Y LDH A LAS MUESTRAS A) AI, B) AH23 Y C) AH30.....	106
FIGURA 29. EFECTO DOSIS-RESPUESTA PARA LAS MUESTRAS SEG1, SEG2 Y SEG3 DE A) AH23 Y B) AH30.....	107
FIGURA 30. TRATAMIENTO SIMULTÁNEO DE M1-M80 EN CACO-2 CCL20:LUC.. ....	108
FIGURA 31. TRATAMIENTO SIMULTÁNEO DOSIS-RESPUESTA PARA M1 Y M2 EN CACO-2 CCL20:LUC.....	109
FIGURA 32. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN M1 Y M1 POR LDH Y MTT EN CACO-2 CCL20:LUC. ....	110
FIGURA 33. ENSAYO DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LUCIFERASA EN CACO-2 CCL20:LUC. FRACCIONES F1-F15 DE M1 Y M2 .....	111
FIGURA 34. ENSAYO DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA EN CÉLULAS CACO-2 CCL20:LUC. FRACCIONES F6, F9, F12, F13 Y F14.....	112
FIGURA 35. ENSAYO DE MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA EN CACO-2 CCL20:LUC. PÉPTIDOS P1, P2, P3 Y P5. ....	114
FIGURA 36. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR EN P2, P3 Y P5 POR LAS TÉCNICAS DE MTT, RN Y LDH. ....	115
FIGURA 37. EXPRESIÓN RELATIVA DE MRNA DE LA QUIMIOQUINA CCL20 POR QPCR EN CACO-2.....	116

FIGURA 38.EFECTO DOSIS-RESPUESTA EN LA SÍNTESIS DE CCL20 POR ELISA INDIRECTO .....	117
FIGURA 39. VALORES DE TER EN CÉLULAS CACO-2 EN CULTIVO.....	118
FIGURA 40. CROMATOGRAFÍA POR RP-HPLC A $\lambda$ =210 NM, CORRESPONDIENTE A LOS PICOS DE ELUCIÓN DE LOS PÉPTIDOS P1, P2, P3 Y P5. ....	120
FIGURA 41. . TRANSPORTE PEPTÍDICO TRANSEPITELIAL EN MONOCAPA DE CÉLULAS CACO-2. PÉPTIDOS P1, P2, P3 Y P5. ....	121
FIGURA 42. TIPOS DE HIPERSENSIBILIDAD. CÉLULAS Y MOLÉCULAS INVOLUCRADAS....	127
FIGURA 43. MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO.....	131
FIGURA 44. MEDIADORES IMPLICADOS EN LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I. .....	138
FIGURA 45. GALT ORGANIZADO O INDUCTOR DE LA RESPUESTA INMUNITARIA.....	143
FIGURA 46. ESTRUCTURA DE CÉLULAS M Y PRODUCCIÓN DE IGA EN SITIOS INDUCTORES.....	145
FIGURA 47. ACTIVACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS TCD4+. ....	147
FIGURA 48. CUANTIFICACIÓN DEL PUNTAJE O SCORE CLÍNICO POST-DESAFÍO ORAL....	150
FIGURA 49. PRUEBA CUTÁNEA EN ALMOHADILLA PLANTAR IZQUIERDA Y DERECHA. ....	152
FIGURA 50. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE IGE ESPECÍFICO A PLV. ....	154
FIGURA 51. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE IGG1 E IGG2A. ....	155
FIGURA 52. INCREMENTO RELATIVO DE MRNA DE CCL20 POR QPCR, EN LA PRIMERA PORCIÓN INTESTINAL DE RATÓN.....	157
FIGURA 53. CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS IL-5, IL-13 E IFN- $\gamma$ EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO DE ESPLENOCITOS DE RATÓN.....	158



# Índice de tablas

---

TABLA 1. CURVA DE ELUCIÓN DE LA FASE MÓVIL .....	17
TABLA 2. ESCALA DE PUNTAJE O SCORE UTILIZADA PARA CARACTERIZAR LA INTENSIDAD DE LOS SIGNOS CLÍNICOS INDUCIDOS LUEGO DEL DESAFÍO ORAL.....	50
TABLA 3. LONGITUD PROMEDIO (L)) DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS BIOPEP .....	63
TABLA 4. CONTENIDO DE HUMEDAD, CENIZAS Y PH DE LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30.....	64
TABLA 5. SOLUBILIDAD, CONTENIDO PROTEICO Y %GH DE AI, AH23 Y AH30.....	64
TABLA 6. TEMPERATURAS Y ENTALPÍAS DE DESNATURALIZACIÓN DE LAS MUESTRAS AI, AH23 Y AH30 .....	66
TABLA 7. NÚMERO DE PICOS Y ÁREA INTEGRADA A $\lambda=210$ NM, SEG1, SEG2 Y SEG3.....	72
TABLA 8. NÚMERO DE PICOS Y ÁREA INTEGRADA A $\lambda=280$ NM, SEG1, SEG2 Y SEG3.....	73
TABLA 9. MUESTRAS M1-M80 OBTENIDAS POR ELUCIÓN DE AH30.....	74
TABLA 10. MUESTRA M1 Y M2. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE PICOS .....	77
TABLA 11. FRACCIONES F1 - F15 A DISTINTOS TIEMPOS DE ELUCIÓN.....	78
TABLA 12. PÉPTIDOS SECUENCIADOS A PARTIR DE LAS MUESTRAS F6, F9, F12, F13 Y F14, PROVENIENTES DE M2 .....	80
TABLA 13. SECUENCIAS PEPTÍDICAS HALLADAS EN PROTEÍNAS PRESENTES EN SUBREINO DE PLANTAS VERDES ( <i>VIRIDIPLANTAE</i> ).....	81
TABLA 14. . RESULTADO DE LA BÚSQUEDA DE LA SECUENCIAS PEPTÍDICAS LENAIDK Y LENAIDKK EN LA BASE DE DATOS NCBI, RESTRINGIDA AL GÉNERO <i>AMARANTHUS</i> , MEDIANTE EL USO DE BLAST.....	83
TABLA 15. CONFORMACIÓN DE GRUPOS (G1-G9), POR ALINEACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOPEP CON LOS SECUENCIADOS DE AMARANTO .....	84
TABLA 16. CARACTERÍSTICAS DE LOS PÉPTIDOS SINTETIZADOS .....	88
TABLA 17. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDAD. ....	128
TABLA 18. PRINCIPALES MEDIADORES EN LA HIPERSENSIBILIDAD TIPO I .....	133
TABLA 19. MANIFESTACIONES CLÍNICAS POR ALERGIA ALIMENTARIA ATÓPICA.....	136

TABLA 20. LTH1 Y LTH2 DE RATÓN, PRINCIPALES FUNCIONES Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS. ....	139
--	-----

---

# Abreviaturas

---

<b><math>\beta</math>-Lg</b>	$\beta$ -lactoglobulina
<b><math>\epsilon</math></b>	Coeficiente de extinción molar
<b><math>\lambda</math></b>	Longitud de onda
<b><math>\lambda_{\max}</math></b>	Longitud de onda máxima de emisión de la fluorescencia
<b><math>\Delta H_d</math></b>	Entalpia de desnaturalización
<b>%Gh</b>	Porcentaje Grado de hidrólisis
<b>% p/p</b>	Porcentaje peso en peso
<b>% p/v</b>	Porcentaje peso en volumen
<b>2-ME</b>	2-mercaptoetanol
<b>AA</b>	Aminoácidos
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AH23</b>	Muestra Hidrolizado proteico de 23% Gh
<b>AH30</b>	Muestra Hidrolizado proteico de 30% Gh
<b>AI</b>	Muestra Aislado proteico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>ANS</b>	8-anilino-1-naftalensulfonato de amonio
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>CB</b>	Caseína bovina
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>DO</b>	Desafío oral
<b>DSS</b>	Dextrán sulfato de sodio

<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAST</b>	Ensayo enzimático de alérgeno adsorbido
<b>EII</b>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
<b>FAL</b>	Fosfatasa Alcalina
<b>FlhC</b>	Flagelina
<b>GALT</b>	Tejido linfático asociado a la mucosa gastrointestinal
<b>H<sub>o</sub></b>	Hidrofobicidad superficial
<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase – Peroxidasa de rábano picante
<b>Id</b>	Intradérmica
<b>IF</b>	Intensidad de fluorescencia
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gama
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Ig</b>	Intragástrica
<b>I<math>\kappa</math>B-<math>\alpha</math></b>	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IPTG</b>	Isopropil 1-b-D-tiogalactopiranosido
<b>Iv</b>	Intravenosa
<b>Lb</b>	Medio de cultivo Luria Bertani
<b>LB</b>	Linfocito B
<b>LP</b>	Lámina propia
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT</b>	Linfocito T
<b>mAb</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>MLN</b>	Ganglios linfáticos mesentéricos
<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa

<b>OPD</b>	o-fenilendiamina
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PBS</b>	Buffer fosfato de sodio
<b>PC</b>	Prueba cutánea
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PLV</b>	Proteínas de leche de vaca
<b>PNPP</b>	p-nitrofenilfosfato de sodio
<b>PP</b>	Placa de Peyer
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Sc</b>	Sub-cutánea
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
<b>SE</b>	Suero equino
<b>SF</b>	Solución fisiológica
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>TBS</b>	Tris buffer de sodio
<b>TC</b>	Toxina colérica
<b>Td</b>	Temperatura de desnaturalización
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
<b>Th</b>	Linfocito T helper (colaborador)
<b>TNBS</b>	Ácido trinitrobencensulfónico
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador



# ***Introducción general***

---

Día a día los consumidores se tornan más exigente respecto a la calidad de los alimentos que consumen, no sólo en lo que respecta a los aspectos nutricionales y organolépticos, sino también a los posibles beneficios que pueden aportar a su salud. Esta actitud se fundamenta en las numerosas evidencias que indican que la incidencia de enfermedades crónicas típicas de las sociedades modernas, muchas de ellas de origen inmunológico, se encuentran asociadas a la ingesta de determinados tipos de alimentos (Feillet and Bach 2004, Bach 2005, Grammatikos 2008, Jones 2008, Klement, Lysy et al. 2008, Savu, Potter et al. 2008, Weinstock and Elliott 2009, Okada, Kuhn et al. 2010, Chatterton, Nguyen et al. 2013).

Además, se ha demostrado la presencia en los alimentos de compuestos bioactivos, con efectos fisiológicos benéficos para la salud del consumidor. A estos alimentos se los denomina **alimentos funcionales** ((E.C.) 2007), y entre los **compuestos bioactivos** caracterizados podemos mencionar flavonoides, catequinas, licopenos, polifenoles, ácidos grasos insaturados, glucosinolatos, proteínas, péptidos, etc. con distintos efectos biológicos: reducción del colesterol (LDL), reducción del riesgo de contraer o desarrollar ciertos tipo de cáncer y enfermedades cardiovasculares, de regulación del sistema inmune, etc. (Hasler 2002, Kanu, Zhu et al. 2007).

La explotación óptima de estos compuestos bioactivos para la nutrición humana y la salud es un desafío científico y tecnológico, a la vez que ofrecen una posibilidad cierta de transferencia al sector comercial (Sloan 1999). Estos compuestos pueden ser incorporados como ingredientes en nuevos alimentos funcionales, ser utilizados en la formulación de suplementos dietarios y/o ser empleados por la industria farmacéutica. Las formulaciones "a medida" se están desarrollando a nivel mundial con el objetivo de mejorar la salud de los habitantes a través de la nutrición.

Existe un creciente reconocimiento del rol de las proteínas como componentes fisiológicamente activos. Muchas proteínas presentes en alimentos ejercen su acción fisiológica en forma nativa, o como péptidos provenientes de su hidrólisis, constituyendo por lo tanto una rica fuente de **péptidos bioactivos**. La actividad de los péptidos es inherente a su composición aminoacídica y a su secuencia. Dichos péptidos pueden ser liberados por hidrólisis enzimática *in vitro*, como producto de la actividad degradativa de ciertos microorganismos (durante los procesos de fermentación, por ejemplo), o como



resultado de la hidrólisis gastrointestinal que sufren las proteínas en el organismo al ser ingeridas (Pimenta and Lebrun 2007).

La actividad biológica de los péptidos luego de la administración oral, incide sobre la mayoría de los sistemas del organismo, como son el cardiovascular, digestivo, nervioso e inmune; desarrollando actividades antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, hipocolesterolémica, antihipertensiva e inmunomoduladora (Fitzgerald and Meisel 2003, Shimizu 2004, Korhonen and Pihlanto 2006, Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008, Shimizu 2010, Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012).

Hoy en día la fuente más importante de péptidos bioactivos corresponde a las proteínas de leche, a partir de las cuales se están identificando un número creciente de ellos, ya sea en hidrolizados o en productos lácteos fermentados (Korhonen and Pihlanto 2003). Asimismo, existe abundante información acerca de la presencia de péptidos bioactivos provenientes de proteínas vegetales como soja, trigo, maíz, arroz, cebada, trigo forrajero y girasol, entre las más estudiadas (Wang and De Mejia 2005).

En los últimos años ha surgido un gran interés por viejos cultivos, tales como Quínoa, Chía y Amaranto, empleados antes de la conquista de América por Incas, Mayas y Aztecas. Desde el punto de vista de la salud humana nos interesa en particular el **Amaranto** dado que son muchos los beneficios que presenta, ya sea a partir de sus hojas, como de sus semillas. El Amaranto, más allá de sus beneficiosas propiedades nutricionales, constituye una fuente de alimentos funcionales. Sus proteínas libres de prolaminas reactivas, representan una alternativa nutritiva para la alimentación de pacientes con enfermedad celíaca. Se ha descripto además, la presencia en el grano de Amaranto de fitoquímicos que pueden ejercer efectos fisiológicos benéficos en humanos, tales como las lectinas, polifenoles, saponinas, inhibidores de tripsina y fitatos (Guzmán-Maldonado and Paredes-López 1998). También contienen péptidos bioactivos codificados en las proteínas de almacenamiento de los granos, que exhiben propiedades antioxidante, antitrombótica y antidiabética. En conjunto estas propiedades convierten a las proteínas de Amaranto en una opción atractiva para reducir el riesgo de ciertos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Vecchi and Añón 2009, Barrio and Añón 2010, Tironi and Añón 2010, Fritz, Vecchi et al. 2011, Huerta-Ocampo and Barba de la Rosa 2011, Caselato-Sousa and Amaya-Farfán 2012, Delgado, Galleano et al. 2015, Sabbione, Scilingo et al. 2015).

En la actualidad existen muy pocas evidencias sobre una posible **actividad inmunomodulatoria** de péptidos codificados en las proteínas de almacenamiento de granos de amaranto (Hibi, Hachimura et al. 2003). Por esta razón, este trabajo se centra en estudiar el efecto inmunomodulador de componentes presentes en el grano de Amaranto sobre células del intestino.

El **sistema inmune asociado al intestino** constituye la parte más compleja y extensa del sistema inmune en general. Las células del intestino están expuestas permanentemente a gran cantidad de antígenos (del medio ambiente, de la dieta y de la microbiota), pudiendo distinguir entre los patógenos invasores y los antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de las bacterias comensales. Para poder cumplir con esta función, y que el intestino pueda mantener sus funciones nutricionales, el **epitelio intestinal** constituye un elemento esencial de la mucosa, actuando como una barrera física y al mismo tiempo como un componente activo del sistema inmune, y central en los procesos absorbivos de nutrientes lumbinales. Ante la presencia de microorganismos patógenos se montan respuestas inflamatorias tendientes a contener la invasión bacteriana. Estas incluyen la secreción luminal de péptidos antimicrobianos, la liberación de quimioquinas y citoquinas en el tejido para reclutar y activar diferentes subconjuntos de células. De esta manera se pone en juego una compleja red de mecanismos, muchos de los cuales aún desconocidos, tendientes a re-establecer la homeostasis intestinal. En este complejo escenario, las células epiteliales intestinales desempeñan un papel central en el mantenimiento de la fisiología intestinal (Nenci, Becker et al. 2007). En esta respuesta inflamatoria local el factor de transcripción NF- $\kappa$ B juega un rol clave en el control de la activación celular. Señales intra o extracelulares pueden activar esta vía e inducir la expresión de varios genes que van a mediar los procesos inflamatorios. En este trabajo de tesis, se ha analizado el efecto de péptidos contenidos en proteínas presentes en las semillas de Amaranto en la modulación de la ruta de NF- $\kappa$ B. Como sistema modelo de estudio hemos empleado células epiteliales del colon humano, que son plausibles de ser activadas de manera NF- $\kappa$ B-dependiente a través de la flagelina bacteriana, para inducir la secreción de la quimioquina CCL20, entre otras. La flagelina induce la activación celular a través de la unión a los receptores de membrana TLR-5. Los hallazgos *in vitro* e *in vivo* obtenidos en este trabajo, indican que las proteínas de amaranto encriptan péptidos con propiedades anti-inflamatorias, capaces de **modular la expresión de la quimioquina CCL20** en células epiteliales activadas de colon.

Para demostrar la acción anti-inflamatoria *in vivo* de estos péptidos hemos empleado el modelo murino de alergia alimentaria IgE-mediado. Es ampliamente conocido que el sistema inmune juega un rol central en la patogénesis de las **enfermedades alérgicas**. Citoquinas Th2 como IL-4, IL-5 e IL-13 entre otras, están asociadas a la síntesis exacerbada de IgE, incremento de eosinófilos, hiper-producción de mucus, contracción de la musculatura lisa, etc.(Del Prete, Maggi et al. 1988, Walker, Virchow et al. 1991, Romagnani 1994). Estos eventos originan la mayoría de los signos clínicos asociados a los procesos inflamatorios alérgicos, y en el caso en particular de las alergias alimentarias el proceso inflamatorio se induce en la mucosa intestinal.

Aunque no existen **modelos animales** que reproduzcan en forma exacta lo que ocurre en un individuo alérgico, se han desarrollado distintos modelos que han permitido estudiar en forma detallada las bases moleculares y celulares para comprender distintos aspectos inmunorregulatorios de esta patología. Estos modelos han permitido plantear nuevas estrategias terapéuticas correctivas del sistema inmune, que pueden resultar como base de futuras intervenciones preventivas o correctivas. En este trabajo de tesis, se ha empleado un modelo murino de alergia a proteínas de leche bovina, para evaluar las propiedades anti-inflamatorias de péptidos de proteínas de Amaranto. De esta manera se ha logrado **modular la respuesta inmune Th2-dependiente** específica de alergenos de la leche bovina, administrando por mucosa oral a péptidos sintéticos provenientes de *Amaranthus hypochondriacus*.

*Estos resultados son alentadores para el desarrollo de potenciales alternativas terapéuticas de modulación de los procesos inflamatorios, y para el desarrollo de futuras intervenciones en la salud humana a través del consumo de alimentos funcionales.*



# ***Hipótesis de trabajo y objetivos específicos***

---

## **Hipótesis de trabajo**

La hipótesis de trabajo sobre la cual se han formulado los objetivos específicos es la siguiente: péptidos provenientes de proteínas de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* presentan propiedades anti-inflamatorias capaces de modular la respuesta inmune innata, mediante la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B y la respuesta inflamatoria.

## **Objetivos específicos**

- Obtener, caracterizar y aislar péptidos a partir de hidrolizados de proteínas, provenientes de semillas de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Modular la expresión de la quimioquina CCL20, inducida por flagelina en células epiteliales de colon humano, mediante la administración de hidrolizados proteicos y péptidos sintéticos, provenientes de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Modular *in vivo* la respuesta inmunológica Th2-dependiente específica de proteínas de leche bovina en un modelo en ratón de alergia alimentaria IgE-mediado, mediante la administración oral de péptidos sintéticos provenientes de *Amaranthus hypochondriacus*.



# ***Materiales y métodos***

---



## **1. Preparación de aislado e hidrolizados de Amaranto**

### **1.1 Obtención de las semillas de Amaranto**

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (cultivar 9122), perteneciente a la cosecha 2008, se adquirieron en la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Anguil, La Pampa, Argentina).

### **1.2 Obtención de la harina de Amaranto**

Las semillas de *Amaranthus hypochondriacus* se molieron en un molinillo ciclónico UDY (UDY Corporation, USA) de 1 mm de malla, y luego se tamizaron en tamiz de 10xx (92 µm de diámetro de poro de malla), en la cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata.

La harina resultante se desgrasó en n-hexano (10% p/v) con agitación continua por 5 hs a 25 °C, luego se dejó reposar por otras 24 hs a igual temperatura. Posteriormente se filtró y secó por 12 hs a 25 °C. La harina así obtenida se almacenó a 4 °C.

### **1.3 Preparación del aislado proteico (AI)**

La obtención del aislado proteico (**AI**) de Amaranto a partir de harina desgrasada se efectuó según el procedimiento descripto por Martínez y Añón (Martínez and Añón 1996): La harina desgrasada se suspendió en H<sub>2</sub>O bidestilada (10% p/v) y se ajustó a pH= 9,0 con NaOH 2N (extracción alcalina). La dispersión obtenida se agitó durante 30 min a 25 °C, luego se centrifugó durante 20 min a 9.000 xg a 10 °C en centrífuga Beckman (Beckman DU 650, Beckman Co, USA). Se separó el sobrenadante, se ajustó a pH= 5,0 con HCl 2N (para la precipitación isoelectrica de las proteínas) y se centrifugó a 9.000 xg durante 20 min a 10 °C. El sedimento se suspendió en H<sub>2</sub>O bidestilada (1:3 p/v), y se llevó a pH= 7 con NaOH 0,5N. Posteriormente la suspensión se congeló y se liofilizó en un liofilizador LA Heto (Heto FD4, Lab Equipment, Denmark) conectado a una bomba de alto vacío Vacubrand (Vacubrand RZ 5, Vacubrand, Germany). El liofilizado se molió con mortero y se almacenó herméticamente hasta su utilización a 4 °C.

## 1.4 Preparación de los hidrolizados proteicos (AH)

Los hidrolizados proteicos (AH) de Amaranto se obtuvieron a partir de AI. Las muestras obtenidas, identificadas como **AH23** (hidrolizado proteico de 23% Gh) y **AH30** (hidrolizado proteico de 30% Gh) se diferenciaron por el pH utilizado en la incubación enzimática. La muestra AH23 se obtuvo a partir de una suspensión al 1% p/v de AI a pH= 7,8, fuerza iónica 0,1 M, con buffer fosfato 35 mM (33,3 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 1,7 mmol/L  $KH_2PO_4$ ). Mientras que la muestra AH30 se obtuvo a partir de una suspensión al 1% p/v de AI a pH= 10 con Na(OH) 2N y mantenido en forma constante por adición de Na(OH) 0,5N.

Posteriormente ambos AH se solubilizaron 1 hs a 37 °C en un agitador orbital Environ Shaker (Environ Shaker 3527-1, Lab-Line instruments Inc., USA) y se incubaron con la enzima Alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*, Novozyme Corp., Denmark). Esta enzima escinde enlaces peptídicos en el extremo carboxilo terminal de aminoácidos hidrofóbicos, como Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W), Leucina (L), Isoleucina (I), Valina (V) y Metionina (M). Se utilizaron 80 µL enzima/g AI, manteniéndose la mezcla en agitación constante por 4 hs a 37 °C en el mismo agitador orbital.

La reacción de hidrólisis se detuvo por calentamiento durante 10 min a 85 °C, seguido de congelamiento inmediato con posterior liofilización. El liofilizado se almacenó a 4 °C hasta su posterior uso.

## 2. Caracterización de las muestras

### 2.1 Determinación del contenido de humedad y cenizas

El contenido de  $H_2O$  se determinó mediante el método indirecto (AOAC 1995) (AOAC 935.29), que consiste en pesar las muestras húmedas para luego llevarlas a estufa por 24 hs a 105 °C, alcanzando así un peso constante de materia seca.

El contenido de cenizas se determinó mediante la carbonización de las muestras en mechero, y posterior calcinación de los sólidos obtenidos en mufla a 550 °C por un tiempo mayor a 5 hs, hasta la obtención de cenizas blancas. La cantidad de cenizas se calculó por diferencia de pesada (AOAC923.03).

Todas las determinaciones se realizaron al menos por duplicado.

## 2.2 Determinación del grado de hidrólisis (%Gh)

El parámetro utilizado para describir el resultado de una reacción de proteólisis es el grado de hidrólisis (%Gh), que representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados (Sección 1.2).

El %Gh se determinó utilizando el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) (Kauzmann 1959) (Adler-Nissen 1979), que cuantifica la presencia de grupos aminos libres.

Las muestras se diluyeron 1:14,5 v/v en buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2125 M 1% SDS, pH= 8,2 y se incubaron a 75 °C durante 15 min, posteriormente se diluyeron 1:17 v/v en buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2125 M pH= 8,2, TNBS 0,05%.y se incubaron a 50 °C durante 1 hs en oscuridad. Finalmente, se detuvo la reacción por agregado de 1 mL de HCl 0,15 N, dejándose enfriar al menos por 45 min a 25 °C.

El grado de hidrólisis se calculó haciendo uso de la siguiente expresión:

$$\%Gh = ([\text{NH}_2] - [\text{NH}_2]_0) - ([\text{NH}_2]_{\infty} - [\text{NH}_2]_0)$$

$[\text{NH}_2]$ : Concentración de grupos aminos libres en la muestra tratada.

$[\text{NH}_2]_0$ : Concentración de grupos aminos libres en la muestra sin hidrolizar (AI).

$[\text{NH}_2]_{\infty}$ : Concentración de grupos aminos libres en la muestra hidrolizada completamente.

$$[\text{NH}_2]_{\infty} = (\text{PM}_{\text{aa}})^{-1} \times (1 + f_{\text{lys}}) \times C_{\text{prot}}$$

$\text{PM}_{\text{aa}}$ : Peso molecular promedio de los aminoácidos, en relación con su abundancia en las proteínas de Amaranto (130 g/mol).

$f_{\text{lys}}$ : Proporción del aminoácido Lisina en las muestras (1/15) (Cardamone and Puri 1992).

$C_{\text{prot}}$ : Concentración de proteína utilizada en el ensayo (1 mg/mL).

Se determinó la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman (Beckman DU 650, Beckman Co, USA). Se utilizó Leucina como patrón para la construcción de la curva de calibración, con concentraciones entre 0,225 y 2,25 mM. Las diluciones se efectuaron con el mismo buffer que se prepararon las muestras.

### **2.3 Determinación de la temperatura ( $T_d$ ) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ )**

La calorimetría diferencial de barrido (differential scanning calorimetry - DSC), se basa en el registro de la diferencia de energía que se debe entregar o quitar a una muestra, ya sea para calentarla o enfriarla, con respecto a una referencia inerte en función del tiempo. Estas diferencias se registran como picos positivos o negativos ya sean fenómenos endotérmicos o exotérmicos, respectivamente. El área de los picos se cuantifica como la entalpía del proceso ( $\Delta H$ ). Si no se producen eventos térmicos en la muestra, las temperaturas de la referencia y de la muestra aumentarían linealmente en función del tiempo, pero si ocurre un proceso endo o exotérmico en la muestra, como por ejemplo una desnaturalización en el caso de las proteínas, el equipo deberá entregarle más calor para mantener la misma temperatura que la referencia.

La temperatura ( $T_d$ ) y la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) se determinaron empleando un calorímetro TAQ100 V9.8 Build 296 (TA Instruments, New Castle, Del., USA). El equipo se calibró a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min utilizando indio, ácido láurico y ácido esteárico como estándares de calor y temperatura.

Las muestras proteicas se analizaron de acuerdo al protocolo descrito por Martínez y Añón (Martínez and Añón 1996). Se prepararon cápsulas de aluminio herméticamente selladas, cargadas con 10-15 mg de muestras al 20% p/v en H<sub>2</sub>O bidestilada y posterior estabilización durante 60 min a 25 °C.

Las cápsulas se colocaron en el equipo, luego se llevó la temperatura a 20 °C y se mantuvo en isoterma durante 2 min para equilibrar la muestra, seguidamente se aplicó una rampa de temperatura de 20 °C hasta 140 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Luego de finalizada cada corrida, la cápsula se perforó, y se determinó el contenido de materia seca dejándola en estufa por 24 hs a 105 °C.

Una cápsula doble vacía se utilizó como referencia. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

La temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) corresponde a la máxima temperatura de cada pico en el termograma y su entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ ) se define como el área bajo la curva por gramo de proteína en base seca. Para el análisis de las curvas se utilizó el software Universal Analysis 2000 (Universal Analysis V4.2E, TA Instruments, USA).

## 2.4 Determinación del contenido proteico

### 2.4.1 Proteína total por el método Kjeldahl

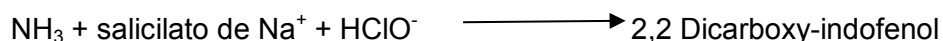
El contenido total de proteína de las muestras se determinaron por el método de Kjeldahl (AOAC 1995) (AOAC 920.53). Se utilizó el factor de conversión 5,85 gramos de proteína/gramo de nitrógeno (Becker, Wheeler et al. 1981).

### 2.4.2 Proteína total por el método Micro-Kjeldahl

El contenido de proteína soluble de las muestras se determinó por el método de Micro-Kjeldahl, el cual consta de una etapa de digestión (Allen 1931) seguida de una de cuantificación haciendo uso del método colorimétrico de Berthelot modificado (Tabacco, Meiatini et al. 1979). Se utilizó el factor de conversión 5,85 gramos de proteína/ gramo de nitrógeno (Becker, Wheeler et al. 1981).

Las muestras se disolvieron en DMEM Adhesión y se agitaron durante 60 min con agitación constante a 650 rpm a 25°C en un agitador Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Germany), luego se centrifugaron a 9200 xg en una microcentrífuga Labnet (Digital Spectrafuge 24D, Labnet International Inc., USA) durante 10 min a 25 °C, posteriormente el sobrenadante se digirió a 425°C en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado por aproximadamente 2,5 hs hasta la aparición de color celeste traslucido, usando como catalizador Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y CuSO<sub>4</sub>.

La metodología colorimétrica utilizada permite determinar el nitrógeno obtenido en la digestión anterior, para ello se procedió a alcalinizar el medio de reacción, convirtiendo el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en NH<sub>3</sub> y este último reacciona con una mezcla de salicilato Na<sup>+</sup>, nitroprusiato de Na<sup>+</sup> e hipoclorito de Na<sup>+</sup>, obteniéndose como producto final un cromóforo azul-verdoso. La intensidad del color se midió a λ=660 nm en un espectrofotómetro Beckman (Beckman DU 650, Beckman Co, USA).



Se usaron los controles de Urea y de SO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, previamente secadas en estufa a 105 °C durante 24 hs. Para la realización de la curva de calibración se utilizó la proteína patrón

seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Chemical Co., USA) a diferentes concentraciones (15 µgN/mL, 30 µgN/mL y 60 µgN/mL), previamente secadas en estufa a 105 °C durante 24 hs.

Los resultados se expresaron como porcentaje de proteína soluble respecto a la cantidad de proteínas presentes originalmente en el material de partida (total) (determinado por Kjeldahl).

### **2.4.3 Proteína soluble por el método de Lowry**

La solubilidad proteica se determinó por el método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951) a partir de suspensiones al 0,1% p/v a pH= 7. Las muestras se incubaron 1 h a 25 °C con agitación constante a 650 rpm, en agitador Thermomixer. Luego se centrifugaron a 9200 xg por 15 min a 25 °C en una microcentrífuga Labnet. La solubilidad (S) se expresó:

$$\% S = ([P]/ [P_i]) \times 100 \times f$$

[P]: Concentración de proteínas en el sobrenadante, determinada por el método de Lowry.

[P<sub>i</sub>]: Concentración de proteínas inicial (total), determinada por el método de Kjeldhal (Sección 2.4.1).

f: Factor de conversión Kjeldhal-Lowry (0,84) (Scilingo, Molina Ortiz et al. 2002).

Para la realización de la curva de calibración se utilizó como proteína patrón seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich Inc., USA) disuelta en el mismo buffer de las muestras. La concentración cercana a 1 mg/mL, se determinó por lectura de absorbancia a 280nm en un espectrofotómetro Beckman y utilizando la ecuación de Lambert-Beer, con el coeficiente de extinción másico  $\epsilon=0,63 \text{ Abs (mg/mL)}^{-1}$ .

## **2.5 Cromatografía de fase reversa (RP-HPLC)**

### **2.5.1 Equipo RP-HPLC**

El tren completo de un equipo HPLC utilizado consta de un sistema automático de Inyección de muestra Waters 717plus Autosampler (Waters, USA), un controlador Waters

600E Multisolvent Delivery System (Waters, USA), un detector Waters 996 Photodio de Array (Waters, USA), una celda termostática Waters TCM (Waters, USA) y un colector de fracciones automático Fraction Colector (FC203B, Gilson Inc., USA).

### 2.5.2 Técnica cromatográfica

La técnica cromatográfica RP-HPLC permite la separación de la muestra en sus componentes en base a diferencias en la hidrofobicidad, existiendo además otros tipos de interacciones que contribuyen en menor medida al proceso de separación, como son el impedimento estérico, la carga iónica y la masa molecular. Para la separación de los componentes presentes en las muestras se aplicó un gradiente lineal de fase móvil orgánica (acetonitrilo) con respecto a la fase móvil acuosa (H<sub>2</sub>O).

Fases móviles:

**Fase móvil A (A):** acetonitrilo (ACN) 2%, H<sub>2</sub>O 98%, ácido trifluoroacético (TFA) 0,065% (v/v) en H<sub>2</sub>O.

**Fase móvil B (B):** acetonitrilo (ACN) 65%, H<sub>2</sub>O 35%, ácido trifluoroacético (TFA) 0,065% (v/v) en H<sub>2</sub>O.

**Tabla 1** Curva de elución de la fase móvil

Tiempo (min)	% A	% B	N° Curva
0	100	0	Isocrática
3	100	0	Gradiente(1)
55	0	100	Isocrática
75	0	100	Gradiente (2)
83	100	0	Isocrática
100	100	0	-

Curva de elución en Gradiente (1) (aplicable entre los 3 - 55 min):

$$\%(A)= 105,77 - 1,92 \times \text{tiempo (min)}$$

$$\%(B)= -5,77 + 1,92 \times \text{tiempo (min)}$$

El gradiente permite la separación de los componentes de la muestra en función de la afinidad del compuesto por la fase móvil con respecto a la fase estacionaria. Utilizando el gradiente H<sub>2</sub>O/ACN, los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de H<sub>2</sub>O (menor tiempo de retención), mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de ACN (mayor tiempo de retención). Se realizaron una serie de pruebas empleando diferentes gradientes H<sub>2</sub>O/ACN con el fin de optimizar la separación de los componentes presentes en las diferentes muestras.

Los espectros de absorción se registraron a  $\lambda$ = 280nm (correspondiente a la absorción de los aminoácidos tirosina, triptofano y fenilalanina) y a  $\lambda$ = 210nm (correspondiente a la absorción del enlace peptídico).

### **2.5.3 Obtención de los Segmentos hidrofílicos, intermedios e hidrofóbicos**

Se realizaron corridas en RP-HPLC de las muestras AH23 y AH30 con el objetivo de separarlas en sus respectivos componentes. Las muestras obtenidas se las agrupó en 3 intervalos, dependiendo de su tiempo de elución: **Segmento hidrofílico (Seg1)**, **intermedio (Seg2)** e **hidrofóbico (Seg3)**.

Las muestras se solubilizaron en buffer fosfato 35 mM (33,3 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH= 7,8) durante 1 hs a 25 °C con agitación constante a 650 rpm en agitador Thermomixer. Posteriormente se centrifugaron a 9200 xg por 15 min a 25 °C en una microcentrifuga Labnet. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas de 0,45  $\mu$ m de diámetro de poro (Millipore, Brasil).

La elución de las muestras AH23 y AH30 se realizó en una columna preparativa SunFire Prep C8, 5  $\mu$ m 10 x 250 mm (Waters Co., Milford, MA, USA) equilibrada con Fase móvil A, sin empleo de pre-columna. La temperatura de trabajo fue de 35 °C, loop: 2000  $\mu$ L, jeringa: 2500  $\mu$ L, tiempo de corrida de 100 min, la presión de columna se mantuvo estable en 2000-2420 psi.

Se inyectaron 2 mL de muestra a una concentración de 25 mg proteína/mL en cada corrida, se utilizó un flujo de elución de 5,2 mL/min. Fase móvil inicialmente con 100% de fase (A) y luego de 3 min se aplicó un gradiente lineal descrito por la curva de elución en gradiente (1) (Tabla 1) hasta los 55 min.



### **2.5.4 Obtención de las muestras M1-M80**

Se realizaron nuevas corridas en RP-HPLC de las muestras AH23 y AH30, en las mismas condiciones antes descritas (Sección 2.5.3), y se recolectaron un total de 80 fracciones (M1-M80) por muestra, correspondientes a un tiempo de retención total de 50 min.

Para ello se utilizó un colector automático Fraction Colector, un volumen de recolección de 3,12 mL/fracción y un tiempo de 0,6 min/fracción. Cada fracción de M1 a M80, provenientes de cinco corridas como mínimo, se agrupó y liofilizó.

### **2.5.5 Obtención de muestras F1-F15**

Con el objetivo de obtener una mayor separación de los componentes que conforman a las fracciones M1 y M2, obtenidas en el ítem anterior (Sección 2.5.4), se procedió a una nueva elución.

Las muestras M1 y M2 se acondicionaron de la forma indicada en la Sección 2.5.3. La elución se realizó en una columna analítica Sephasil Peptide C8, 12  $\mu\text{m}$  ST 4,6/250 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). El tiempo de corrida fue de 100 min y la temperatura de elución de 60,0 °C. No se utilizó pre-columna, y la presión de columna varió entre 200-420 psi. Se inyectaron en cada corrida 50  $\mu\text{L}$  de muestra a una concentración normalizada a 0,25 Abs<sub>210nm</sub>, las muestras se eluyeron a un flujo de 1,1 mL/min. Las condiciones de fase móvil y las curvas de gradiente son las mismas que las utilizadas para las muestras AH23 y AH30, descritas en la Sección 2.5.3. Se obtuvieron 15 fracciones: F1 - F15 (2,4 min- 19,5 min), que se recolectaron manualmente. Las fracciones F1 - F15 provenientes de seis corridas para cada muestras M1 y M2 se unificaron y liofilizaron. Las corridas se monitorearon a la longitud de onda de 210 nm y 280 nm.

## **2.6 Electroforesis**

Se empleó la técnica de electroforesis para la separación y caracterización de las proteínas. La movilidad electroforética de una proteína depende de su carga neta así como de su tamaño y su conformación.

El soporte utilizado, poliacrilamida, es interactivo, el cual ayuda en la separación de las proteínas debido a su porosidad, actuando como tamiz. Este soporte es el mayormente utilizado debido a las ventajas que presenta: alta reproducibilidad, estabilidad (a pH, temperatura, fuerza iónica), transparencia, elasticidad, porosidad controlable, compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos e inercia química. La matriz de poliacrilamida se forma por co-polimerización de dos compuestos, la acrilamida y la bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida), en una reacción iniciada por la tetrametiletilendiamina (TEMED) y el persulfato de amonio. El radical persulfato activa al TEMED, el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que se polimerice. Las cadenas de poliacrilamida son entrecruzadas al azar por la bisacrilamida, formándose así una red de porosidad uniforme, que puede ser regulada, variando las condiciones de la reacción y las concentraciones de los monómeros.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)), la más utilizada es la que se lleva a cabo en presencia del tensioactivo aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS). En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con el SDS para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La cantidad de SDS unido a las proteínas es proporcional a su tamaño, el SDS se une a la proteína en una proporción aproximada de 1,4:1. Los complejos proteína – SDS poseen una estructura elipsoide o de bastón, la cadena proteica es distendida y solubilizada por el tensioactivo. Dado que se obtiene una relación final carga/masa constante para las distintas proteínas (se anula su carga intrínseca), estas se van a separar fundamentalmente en base a sus diferencias de peso molecular (PM); siendo a menor PM, mayor movilidad (Hjemeel and Chrambach 1981).

### **2.6.1 Tricina SDS-PAGE**

Se utilizó el sistema discontinuo, de acuerdo a la modificación de Schägger (Schägger 2006) del método descrito por Laemmli (Schagger and Von Jagow 1987), el cual separa las proteínas en el rango de masa de 1-100 kDa; con el objetivo de extender el límite inferior de detección y resolución de los péptidos.

El gel de apilamiento se encuentra formado por tres segmentos:

Apilador (stacking)= 4% T, 3% C

Espaciador (spacer)= 10% T, 3% C

Separador (separating)= 16,5% T, 6% C, urea 36% p/v

T (concentración total): Indica el % p/v de (acrilamida + bis-acrilamida).

C (concentración Reticulado): Indica el % p/v de bis-acrilamida.

La polimerización del Separador y Espaciador se realizaron de manera conjunta a 37 °C, luego se procedió a la polimerización de la región superior Apiladora a la misma temperatura.

Los tamaños de poro disminuyen a medida que aumenta %T, y con la reticulación obtenida con 5%C se logra el menor tamaño de poro posible. Cualquier incremento o disminución en %C aumenta el tamaño de poro (función parabólica), esto es debido a la estructura no homogénea de los filamentos del gel.

La movilidad proteica está restringida por el tamaño del poro. Si se requiere resolver componentes de muy alto PM, se utilizan geles del 5% al 7,5% T. Los geles de poro intermedio (10-12% T) proveen una separación adecuada de proteínas de 10-90 kDa. Mientras que los geles de poro menor (15-20% T) son útiles en la separación de péptidos de bajo peso molecular (1-10 kDa).

Se utilizó el compuesto orgánico Tricina (N- (tri (hidroximetil) metil)) glicina) como solución buffer, el cual deriva del tris (tri (hidroximetil) amino metano) y la glicina. Debido a su elevada fuerza iónica provoca un importante movimiento de iones y por consiguiente una disminución en el movimiento de las proteínas, permitiendo así una mayor separación de las proteínas de bajo peso molecular, en el rango de 1 a 100 kDa.

### **2.6.2 Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras**

La corrida se realizó del mismo modo que la electroforesis desnaturizante, pero con el agregado de 2-mercaptoetanol (2-ME) al buffer de muestra. Este compuesto reduce los enlaces disulfuros, contribuyendo a la desnaturizar de las proteínas, y por consiguiente induciendo el desplegamiento de algunas estructuras terciarias y desestabilizando las estructuras cuaternarias (subunidades oligoméricas).

### 2.6.3 Técnica empleada

#### 2.6.3.1 Preparación de las muestras

Las muestras se disolvieron en buffer muestra, a una concentración final de proteína aproximada de 2,5 mg/mL, se calentaron por 1 min a 100 °C y se sembraron 8-12 µl por calle, 20-30 µg proteína/calle. Para correr en condiciones reductoras, se adicionó al buffer muestra un 5% de 2-ME.

#### 2.6.3.2 Buffers

Se utilizó el sistema de buffers descrito por (Laemmli 1970):

**Buffer anódico:** Tris 0,1 M, HCl 0,0225 M, pH= 8,9.

**Buffer catódico:** Tris 0,1 M, Tricina 0,1 M, SDS 0,1% p/v, pH= 8,25.

**Buffer de muestra:** Tris 50 mM, glicerol 12% p/v, SDS 4% p/v, 2-ME 2%, Coomassie blue G 0,01 % p/v, HCl hasta llegar pH= 7,0.

**Buffer gel:** Tris 3 M, SDS 0,3 % p/v, HCl 1 M, pH= 8,45.

N', N', N', N', tetrametiletilendiamina (TEMED): 0,033-0,075 % v/v

Persulfato de amonio 10%: 0,33-0,75 % v/v.

#### 2.6.3.3 Desarrollo de corrida

La corrida inicialmente se realizó a un voltaje constante de 30V hasta que el frente del colorante atravesó la región apiladora, para luego elevarse a 100V hasta llegar a los 2 cm finales del gel. Finalmente se aumentó a 150V.

Todas las corridas se realizaron en un equipo de electroforesis Mini Protean II Dual Slab Cell (BIO-RAD, Hércules CA, USA), con separadores de 1 mm de espesor.

Los patrones de PM empleados fueron:

- Muy bajo peso molecular (VLMW): isomerasa triosafosfato (26,6 kDa), mioglobina (17,0 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa), aprotinina (6,5 kDa),  $\beta$ -insulina oxidada (3,5 kDa) y bacitracina (1,4 kDa) (Pharmacia, Amersham, UK).

- Bajo peso molecular (VMW): fosforilasa B (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,4 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,0 kDa) (GE Healthcare, USA).

Los patrones se solubilizaron en 200  $\mu$ l de buffer muestra y se sometieron al mismo tratamiento aplicado a las muestras. Se sembraron 5  $\mu$ L por calle.

#### 2.6.3.4 Fijación, coloración y decoloración

**Fijador:** metanol 50% y ácido acético 10% v/v. Tiempo de contacto: 40 min a 25 °C.

**Colorante:** Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina) al 0,192% p/v en H<sub>2</sub>O 10%, metanol 10% y ácido acético 4% v/v. Tiempo de contacto: 1 a 2 hs.

Cuando la cantidad de proteína no fue la suficiente para ser detectada con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Anedra, Argentina), se realizó la tinción con Ag (Blum, Beier et al. 1987).

**Decolorante:** Metanol 25% y ácido acético 10% v/v. Tiempo de contacto: 2 hs, con cambios de solvente cada 40 min aproximadamente. Finalmente el gel se transfiere a H<sub>2</sub>O destilada.

#### 2.6.3.5 Obtención de las imágenes y análisis de los geles

Las imágenes de los geles se adquirieron y digitalizaron con un scanner HP Scanjet G2710 (Hewlett-Packard, USA). Los análisis de las bandas de los geles se realizaron mediante el programa ImageJ 1.44p (N.I.H., USA)

### 2.7 Análisis estadístico

Los gráficos y el análisis estadístico de los datos de los diferentes ensayos se realizaron mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., USA). Se realizaron análisis multifactoriales de varianza (ANOVA), seguidos del test de Bonferroni y/o Tukey's para discriminar las diferencias significativas entre las medias de las distintas variables.

### 3. Secuenciación, análisis bioinformático y síntesis peptídica

#### 3.1 Secuenciación peptídica por Nano cromatografía/ Espectrometría de masa (UHPLC/ ESI-MS)

El proceso de secuenciación consistió inicialmente en la separación de los péptidos presentes en las muestras mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución (ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)) a escala nano, haciendo uso del equipo The UltiMate 3000 RSLC-nano System (Dionex, Thermo Fisher Scientific Inc., Netherlands) (Rouessac and Rouessac 2013). Se utilizó una columna capilar de fase reversa PepMap RSLC C18, con un tamaño de partícula de 2  $\mu\text{m}$ , 100 Å de tamaño de poro y 75  $\mu\text{m}$  id., por 15 cm de largo, (Dionex, Netherlands). La columna se equilibró inicialmente con el solvente A (99%  $\text{H}_2\text{O}$ , 1%  $\text{HCOOH}$ ), luego se procedió a la elución de las muestras por 30 min con un gradiente lineal de 2% a 50% del solvente B (10%  $\text{H}_2\text{O}$ , 90% acetonitrilo, 0,08% v/v  $\text{HCOOH}$ ), a una velocidad de flujo de 300 nL/min.

La identificación de los aminoácidos que conforman los péptidos se realizó en un espectrómetro de masa (ESI-MS), que se encuentra acoplado al equipo de UHPLC. El equipo ESI-MS está formado por un dispositivo electromagnético generador de iones a partir de macromoléculas (Electrospray ionization - ESI) (Ho, Lam et al. 2003) asociado a un analizador de masa (MS) ORBITRAP Velos (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). (Hu, Noll et al. 2005).

El estudio de espectrometría de masas se llevó a cabo en el sector “Biopolymers-Structural Biology”, en el Centro INRA (Angers-Nantes, Francia (<http://centres.inra.fr>)).

#### 3.2 Herramientas bioinformáticas

##### 3.2.1 Identificación por homología en el subreino plantas verdes

Se realizó un análisis de similitud secuencial de los péptidos sintetizados con los provenientes de la base de datos de NCBI (The National Center for Biotechnology Information) restringida a proteína del subreino plantas verdes (*Viridiplantae*), y además en casos particulares, se restringió al género *Amaranthus*. Se utilizó el software Standard protein - protein **BLAST (blastp)** (Altschul, Madden et al. 1997), variante del programa

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), se fijó como parámetros a la matriz de sustitución BLOSUM62, Data base Non-redundant protein sequences, y con el resto de las condiciones en default (Gap open 10.0, Gap extend 1.0, etc.) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El parámetro E-valor (E-value) de corte, nos permitió definir qué alineamiento es significativo estadísticamente. Cuanto menor sea este valor, más significativo es su alineamiento. El E-valor depende del tamaño de la base de datos utilizada. Para la base de datos no redundante (NR) de NCBI por lo general valores de E-valor de 0,01 o menores, son considerados significativos.

### **3.2.2 Determinación de la potencial actividad inmunomoduladora**

Se empleó el software **EMBOSS Needle** (con una matriz BLOSUM62 y el resto en condiciones de default (Gap open 10.0, Gap extend 0.5, End open 10.0, End extend 0.5, gap penalty: 10.0, Extend penalty: 0.5)), ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)). El programa EMBOSS Needle (European Molecular Biology Open Software Suite) utiliza el algoritmo Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluyendo gaps) de 2 secuencias a lo largo de toda su longitud, mediante la exploración de todas las alineaciones posibles. El objetivo es obtener el máximo score, determinado por el % de similitud e identidad (Rice, Longden et al. 2000); cuanto mayor sea este valor, mayor será la similitud que poseen los péptidos que se comparan.

Se utilizó la matriz de sustitución BLOSUM (blocks of amino acid substitution matrix) (Henikoff and Henikoff 1992) para el alineamiento de secuencias de proteínas evolutivamente divergentes, que codifica probabilidades de sustitución derivadas empíricamente. En particular, utilizamos la matriz BLOSUM 62, que es la matriz calculada usando las sustituciones observadas entre proteínas que tienen, como mínimo, el 62% de identidad en la secuencia (Eddy 2004).

### **3.2.3 Determinación de las secuencias peptídicas consensos**

Se utilizó el programa **ClustalW2**, que es una variante ponderada del método de alineamiento progresivo Clustal (Higgins and Sharp 1988). Teniendo como parámetros una matriz BLOSUM62 (sección 3.2.2) y con el resto de las condiciones en default (Gap

penalty 10,0, Gap open 10,0 y GAP extensión: 0,2))  
(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### 3.3 Síntesis peptídica mediante técnica en fase sólida (SPPS)

La síntesis peptídica se realizó mediante la técnica de síntesis peptídica en fase sólida (solid phase peptide synthesis -SPPS), (Merrifield 1963) Se utilizaron 2 métodos, dependiendo del péptido a sintetizar: el método **Fmoc** (utiliza una base débil para eliminar el grupo protector temporal del extremo  $\alpha$ -amino, 9-fluorenilmetoxycarbonilo) y el **t-Boc** (utiliza un ácido débil para eliminar el grupo protector temporal del extremo  $\alpha$ -amino, terc-butiloxycarbonilo). Luego de la escisión de los péptidos de la resina del soporte sólido, los péptidos se purificaron por RP-HPLC usando una columna Kromasil 100-5 C18, 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m (AkzoNobel, Sweden). Se utilizaron como solventes de corrida el buffer A con 0,1% TFA en H<sub>2</sub>O y el buffer B con 0,1% TFA en ACN. Se utilizó un gradiente lineal de 10-50% en buffer B en un tiempo de elución de 11 min, con un flujo de elución de 1 mL/min. Posteriormente, las muestras se analizaron a través de un espectrómetro de masas de ionización por electro-espray (ESI-MS), registrándose una pureza mayor al 98%. Los péptidos se sintetizaron a través de esta técnica por ChinaPeptides Co., Ltd., Chuansha, Shanghai, China (<http://www.chinapeptides.com/>).

## 4. Buffers y medios de cultivo

### 4.1 Buffer PBS

El buffer fosfato (PBS, Phosphate Buffered Saline) se utilizó habitualmente en los procedimientos de lavado celular y como diluyente en reacciones colorimétricas.

Su composición es la siguiente: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,144 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,795 g/L, NaCl 9 g/L, H<sub>2</sub>O bidestilada c.s.p 1L, pH: 7 - 7,4. Se esterilizó en autoclave (121 °C durante 15 - 20 min).



## **4.2 DMEM suplementado**

El medio DMEM suplementado se obtuvo a partir del medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essentials medium) con 25 mM de glucosa (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA), resuspendido en H<sub>2</sub>O destilada apirógena para irrigación quirúrgica c.s.p 1 L (Roux Ocefa, Argentina). Se adicionó un 15% v/v de suero fetal bovino (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) previamente inactivado durante 30 min a 56 °C. El medio fue suplementado con un 1 % (v/v) de aminoácidos no esenciales ((GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA). Se agregaron los antibióticos penicilina (10 UI/mL) y estreptomicina (10 µg/mL) (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA). Se llevó a pH= 7,4 con 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>. El medio se esterilizó con filtros Steritop GP Express Plus de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore Co., USA)

## **4.3 DMEM de Adhesión**

El medio DMEM de Adhesión se obtuvo, igual que en el caso del medio DMEM suplementado, a partir del medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essentials medium) con 25 mM de glucosa (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA), resuspendido en H<sub>2</sub>O destilada apirógena para irrigación quirúrgica c.s.p 1 L (Roux Ocefa, Argentina). Se agregaron los antibióticos penicilina (10 UI/mL) y estreptomicina (10 µg/mL) (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA). Se llevó a pH= 7,4 con 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>. El medio se esterilizó con filtros Steritop GP Express Plus de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore Co., USA).

# **5. Líneas celulares**

## **5.1 Caco-2**

La línea celular Caco-2 está constituida por células epiteliales provenientes de un adenocarcinoma de colon humano (intestino grueso) (Fogh 1975). Bajo determinadas condiciones de cultivo, luego de llegar a confluencia, dejan de proliferar y desarrollan una monocapa de células polarizadas con un fenotipo absortivo. Las mismas sufren un

proceso de diferenciación y polarización durante las primeras dos semanas en cultivo, de tal manera que su fenotipo, morfología y función se asemejan a los enterocitos que recubren el intestino delgado (Pinto, Robine Leon et al. 1983, Hidalgo, Raub et al. 1989). De esta manera, las células Caco-2 expresan uniones estrechas (tight junctions), microvellosidades, enzimas y transportadores (peptidasas, estereasas, P-glicoproteínas, transportadores de oligopéptidos, ácidos biliares, ácidos carboxílicos, etc.) que son característicos de los enterocitos.

## **5.2 Caco-2 ccl20:luc**

La línea celular Caco-2 ccl20:luc proviene de células epiteliales Caco-2 transfectadas en forma estable mediante la construcción del gen reportero luciferasa de luciérnaga (*Lampyrisnoctiluca*) bajo el control del promotor de la citoquina CCL20 (ccl20:luc) ((Clément Nempont 2008) (Sección 1.6). La activación del promotor de CCL20 en sitios de unión dependiente de NF-kB se produce en la región de 100 a 300 pb. (Kwon, Keates et al. 2003).

## **5.3 Crecimiento y recuento celular**

Las células Caco-2 y Caco-2 ccl20:luc se cultivaron en placas de cultivo de 6, 12 y 48 fosas (Cell Star®, GBO, USA), inoculando  $2,5 \times 10^5$  células/mL. Se incubaron en estufa a 37 °C en atmosfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub>. El recambio del medio de cultivo DMEM suplementado se realizó cada 2 días. Para los ensayos de modulación y toxicidad, se utilizaron células en estado de confluencia (mayor a 7 días de incubación).

Para su repique semanal, las células fueron tripsinadas con TrypLE Express (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, MD, USA). Se realizó el recuento de células viables mediante tinción con Tripan Blue 1% v/v (Invitrogen, USA) y el uso de cámara de Neubauer (Marienfeld, Alemania).

## 6. Obtención y purificación de flagelina (FliC)

### 6.1 Obtención de FliC

El protocolo de producción de flagelina se basó en la recuperación de los flagelos a partir del crecimiento de *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* SIN22 (Sierro, Dubois et al. 2001). Las bacterias se cultivaron en medio de cultivo líquido Luria Broth (LB): (10 g triptona, 10 g ClNa, 5 g extracto de levadura, 1 L H<sub>2</sub>O destilada apirógena) toda la noche a 37 °C, en condiciones de baja agitación en agitador orbital Environ Shaker (Environ Shaker 3527-1, Lab-Line instruments Inc, USA) para evitar el desprendimiento de los flagelos por aumento de las fuerzas de corte. Luego se recuperaron las bacterias por centrifugación a 9000 xg durante 30 min a 4 °C en una centrífuga Beckman (Beckman DU 650, Beckman Co, USA) y se resuspendieron en un volumen menor, de manera de obtener una suspensión bacteriana concentrada, que se agitó en vórtex a máxima velocidad pero sin formar espuma, ocasionando la liberación de los flagelos de la superficie bacteriana. Posteriormente se centrifugó a 9000 xg durante 30 min a 4 °C en la misma centrífuga. Al sobrenadante se lo ultracentrifugó a 40.000 rpm durante 1h 30 min a 4 °C en una ultracentrífuga Beckman (Beckman ultracentrifuge, Beckman Co, USA), luego al precipitado, que contiene FliC más impurezas, se lo resuspendió en PBS. Posteriormente se centrifugó a 9200 xg por 15 min a 25 °C en una microcentrífuga Labnet (Digital Spectrafuge 24D, Labnet International Inc, USA), preservando el sobrenadante donde se encuentra la flagelina (Montie and Stover 1983) (Ibrahim, Fleet et al. 1985) (Hiriart, Errea et al. 2012).

### 6.2 Detoxificación de FliC

La flagelina obtenida de esta manera puede estar contaminada por componentes bacterianos pro-inflamatorios como los liposacáridos (LPS) de la pared celular de las bacterias Gram (-). Los LPS son capaces de unirse a los receptores TLR-4, por lo que la disminución de la carga de pirógenos resulta esencial para que la activación celular sea TLR-5-dependiente. La detoxificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, utilizando una columna de agarosa granulada sobre la que se ha inmovilizado el antibiótico Polimixina B, que presenta afinidad por el LPS. Este procedimiento permitió

reducir la presencia de LPS, contaminante habitual en las preparaciones de flagelina. Este procedimiento se realizó según el protocolo de trabajo del kit Detoxi-Gel™ Endotoxin (Thermo Scientific, USA): se regeneró la columna de agarosa granulada Polimixina B con Desoxicolato de Na 1%, luego se lavó y se equilibró mediante 5 lavados sucesivos con H<sub>2</sub>O apirógena. Posteriormente se agregó la muestra de flagelina impurificada disuelta en PBS 10x, se dejó reposar por 1 h para aumentar la retención de LPS, y finalmente se eluyó la muestra con H<sub>2</sub>O apirógena, obteniéndose la flagelina libre de LPS.

### **6.3 Determinación de LPS por test LAL**

El test de lisado de amebocitos del cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (Limulus amebocyte lysate -LAL) se basa en la activación de una cascada de enzimas serino proteasas presentes en el lisado de amebocitos por las endotoxinas LPS (Tsuji and Harrison 1979, Williams 2013). Este procedimiento resulta fundamental cuando se requiere caracterizar la actividad estimuladora de la respuesta inmune innata de una molécula, debido a que se puede incurrir en el error de atribuirle propiedades que no posee, debiéndose el efecto observado a trazas de contaminantes (LPS).

El grado de activación está relacionado con la concentración de endotoxinas presente en la muestra, el mismo se determinó por el método *in vitro* de gelificación Gel-cot. Se utilizó el kit Pyrogent® gel Clot Assays (Lonza Walkersville, Inc., USA).

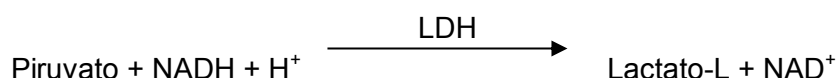
El material de vidrio fue despirogenizado por calor seco a 180 °C por 4 hs. Luego se colocaron en cada tubo, 100 µL de muestra con 100 µL del kit Pyrogent® gel Clot Assays y se incubaron por 1 h a 37 °C. Se leyó el ensayo por inversión cuidadosa de los tubos de reacción a un ángulo de 180°. La presencia de un gel sólido que resistió sin colapsar la inversión del tubo se registró como coágulo (+), cualquier otra condición se determinó como coágulo (-). Paralelamente se realizó una curva patrón, desde 0,00001 µg/mL hasta 1 µg/mL de LPS, obteniendo la formación de un coágulo (+) a 0,01 µg/mL (sensibilidad del ensayo). Por lo tanto, las muestras en las que se evidencia la formación de coágulo (+), tienen un nivel de endotoxina mayor o igual al punto de corte determinado por la curva patrón (0,01 µg/mL LPS).

## 7. Citotoxicidad celular

### 7.1 Determinación de la actividad enzimática Lactato deshidrogenasa (LDH)

En el modelo *in vitro*, la liberación de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) al medio extracelular es un indicativo del daño en la integridad celular. Esta enzima cataliza la conversión de piruvato a lactato, utilizando NADH como cofactor. El rol que desempeña es esencial para la célula, ya que permite regenerar  $\text{NAD}^+$  y así continuar con el ciclo de la glucólisis, única fuente de ATP en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno.

La integridad celular se evaluó mediante la determinación de la actividad enzimática de LDH en medio extracelular (Choksakulnimitr, Masuda et al. 1995):



Se utilizó la línea celular Caco-2, crecida en placas de cultivo de 48 fosas. Una vez que el cultivo celular llegó a confluencia, se incubó por 4 hs en DMEM Adhesión sin color, con el agregado del agonista de la inmunidad innata FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) en conjunto con la muestra de interés.

Luego de transcurridas 4 hs de incubación, se trasvasó el sobrenadante (conteniendo potencialmente a la enzima LDH) a placa de 48 fosas, y se realizó la lectura de la absorbancia a  $\lambda=340$  nm en un espectrofotómetro Beckman (Beckman DU 650, Beckman Co, USA).

La enzima LDH se cuantificó siguiendo las especificaciones del protocolo del kit comercial LDH-P UV unitest (Wiener Lab, Argentina). El sustrato comercial reconstituido posee piruvato 0,6 mM y NADH 0,18 mM. En presencia del sustrato, la enzima LDH transforma el piruvato a lactato, oxidando el NADH. La disminución de este último, implica una caída en la absorbancia a 340 nm.

La actividad enzimática (UI) se expresó como la absorbancia/min ( $\Delta A/\text{min}$ ). Se calculó como el promedio de la diferencia en las absorbancias, a los tiempos 0,5 min, 1,5 min, 2,5 min y 3,5 min. Luego se multiplicó por un factor de corrección, según el protocolo del fabricante, de 4921 a 25 °C. Cada determinación se realizó por triplicado.

La citotoxicidad se cuantificó en términos del porcentaje de liberación de LDH:

$$\% \text{ LDH} = (\text{LDH}_{\text{muestra}} / \text{LDH}_{\text{total}}) \times 100$$

$\text{LDH}_{\text{muestra}}$ : absorbancia de las muestras de interés.

$\text{LDH}_{\text{total}}$ : absorbancia del Control (+)

Control (-): incubación con FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) en DMEM Adhesión sin color.

Control (+): incubación con detergente Tritón X-100 3% (v/v) (Sigma - Aldrich Inc., USA) en DMEM Adhesión sin color. Provoca lisis celular con la consiguiente extravasación de la enzima LDH al medio extracelular.

## 7.2 Determinación de la actividad enzimática oxidorreductasa (MTT)

Se midió la viabilidad de las células eucariotas a través de la reducción de la sal amarilla **MTT** (bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolio) (Sigma - Aldrich Inc., USA) por escisión del anillo de tetrazolio, obteniendo el compuesto formazán, de color púrpura e insoluble en soluciones acuosas (Figura 1).

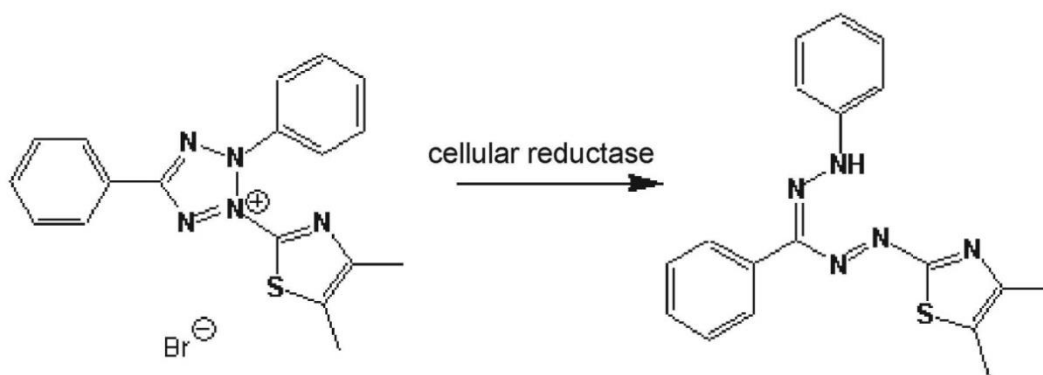


Figura 1. Reacción de reducción del reactivo MTT por enzimas oxidorreductasas

La carga positiva del ion tetrazolio MTT parece ser el factor predominante en la absorción celular a través del potencial de membrana plasmático, además de ser una molécula liposoluble. Por lo tanto, la reducción se produce intracelularmente por las enzimas

oxidorreductasas, la mayoría de las cuales utilizan como cofactor nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH y NADPH) en la reducción del MTT. Las enzimas implicadas no sólo provienen de las mitocondrias, sino también del citoplasma y de las membranas no mitocondriales, incluyendo el compartimento endosomal/lisosomal y la membrana plasmática (Mosmann 1983, Berridge, Herst et al. 2005).

La reducción de MTT se lleva a cabo sólo cuando las enzimas oxidorreductasas están activas, y por lo tanto un incremento en el número de células viables se traduce en un aumento en la síntesis de formazán y por consiguiente en un incremento de la absorbancia.

Las células Caco-2 se sembraron ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) en placas de 48 fosas, luego de llegar a confluencia se incubaron por 4 hs en estufa a 37 °C en atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> con las respectivas muestras, en presencia y ausencia de FliC (1,5 µg/mL). Luego se lavaron 2 veces con PBS, y se agregó por fosa 250 µL MTT 0,5 mg/mL en DMEM Adhesión sin color, incubándose en oscuridad por 2 hs en estufa a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se eliminó el sobrenadante (con cuidado de no levantar las células) y los cristales de formazán fueron disueltos con 250 µL/fosa de DMSO. La placa se agitó por 10 min y se transvasó el sobrenadante conteniendo solución de formazán a otra placa de 48 fosas (las células en monocapa quedaron adheridas a la placa inicial) para la lectura de la absorbancia a  $\lambda=550$  nm en Lector Multi-Modal de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA).

El porcentaje de actividad enzimática remanente fue calculado como:

$$\% \text{ MTT} = (\text{MTT}_{\text{muestra}} / \text{MTT}_{\text{total}}) \times 100$$

MTT<sub>muestra</sub>: absorbancia de las muestras de interés.

MTT<sub>total</sub>: absorbancia del Control (-).

Control (-): incubación con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión sin color.

Control (+): incubación con Etanol 25% (v/v) en DMEM Adhesión sin color. Provoca lisis celular.

### 7.3 Ensayo de absorción del colorante Rojo Neutro (RN)

El ensayo de citotoxicidad por absorción del colorante Rojo Neutro (RN) se basa en la habilidad de las células viables de incorporar y unir al colorante Rojo Neutro. Es un colorante catiónico débil que penetra en las membranas por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas, uniéndose por enlaces hidrofóbicos y electrostáticos a la matriz lisosomal (Winckler 1974).

Cuando la célula muere, el colorante no puede ser retenido y es liberado al medio extracelular. En consecuencia, la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables. Además, la captación de Rojo Neutro por las células viables se modifica por alteración en la superficie celular o en las membranas lisosomales. La integridad lisosomal, con la concomitante unión del colorante Rojo Neutro, es un indicador muy sensible de la viabilidad celular (Filman, Brawn et al. 1975).

Las células de la línea Caco-2 se sembraron ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) en placas de 48 fosas, luego de llegar a confluencia se incubaron con las diferentes muestras por 4 hs en estufa a 37 °C en atmosfera de 5 % CO<sub>2</sub>, a continuación se lavaron 2 veces con PBS, y se agregaron 250 µL RN (1mg/mL) en DMEM Adhesión sin color por fosa, incubándose por 2 hs en estufa 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante (con cuidado de no levantar las células) y se fijó la monocapa celular con 250 µL/fosa de CaCl<sub>2</sub> 1% y formaldehído 0,5% por 5 min, luego se lavó con PBS y se extrajo el RN con 200 µL/fosa de DMSO. Se agitó la placa por 10 min y se transvasó el sobrenadante a otra placa de 48 fosas, conteniendo el colorante RN (las células quedaron adheridas a la placa inicial), y se midió la absorbancia a  $\lambda=540$  nm en un Lector Multi-Modal de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, USA) (Repetto, del Peso et al. 2008).

El porcentaje de retención del colorante RN fue calculado como:

$$\% \text{ RN} = (\text{RN}_{\text{muestra}} / \text{RN}_{\text{total}}) \times 100$$

RN<sub>muestra</sub>: absorbancia de las muestras de interés.

RN<sub>total</sub>: absorbancia del Control (-).

Control (-): incubación con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión sin color.



Control (+): incubación con Etanol 25% (v/v) en DMEM Adhesión sin color. Provoca lisis celular.

## **8. Transporte transepitelial de oligopéptidos**

### **8.1 Medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER)**

Un rasgo característico de las células epiteliales es la formación de uniones intercelulares estrechas (tight junctions), resultando en una barrera celular que separa el compartimento apical (luminal) del basolateral (abluminal). El objetivo de este ensayo es cuantificar la conformación de la barrera y posteriormente la integridad de la misma durante el ensayo (Benson, Cramer et al. 2013). Para ello se realizaron mediciones de la resistencia eléctrica transepitelial (TER, transepithelial electrical resistance) generada por la monocapa celular, crecidas sobre insertos transwells Millicell (Cell Culture Insert, Millipore, USA), constituidos por una membrana de policarbonato de 0,4  $\mu\text{m}$  de poro. Se utilizaron dos electrodos (Ag/AgCl) perteneciente al sistema Millicell®-ERS (Millipore, USA), uno a cada lado de la monocapa celular y se midió la resistencia eléctrica generada (R). Para su calibración se utilizó la misma solución electrolítica empleada en las mediciones de las muestras (DMEM Adhesión o DMEM suplementado).

El valor obtenido de TER es independiente del área de la membrana empleada (Figura 2):

$$\text{TER} = (R_m - R_b) \times A = [\text{ohm.cm}^2]$$

$R_m$  = Resistencia de la muestra de interés.

$R_b$  = Resistencia de la muestra Blanco (sin cultivo celular en inserto transwells, con DMEM Adhesión).

A = Área superficial del inserto transwells.

Placa de 24 fosas: los insertos transwells poseen una superficie de membrana y tamaño de poro de 0,6  $\text{cm}^2$  y 0,4  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo en la cámara apical y 600  $\mu\text{L}$  en la cámara basolateral.

Placa de 6 fosas: los insertos transwells poseen una superficie de membrana y tamaño de poro de  $4,2 \text{ cm}^2$  y  $0,4 \text{ }\mu\text{m}$ , respectivamente. Se adicionaron 1,5 mL de medio de cultivo en la cámara apical, y 2,25 mL en la cámara basolateral.

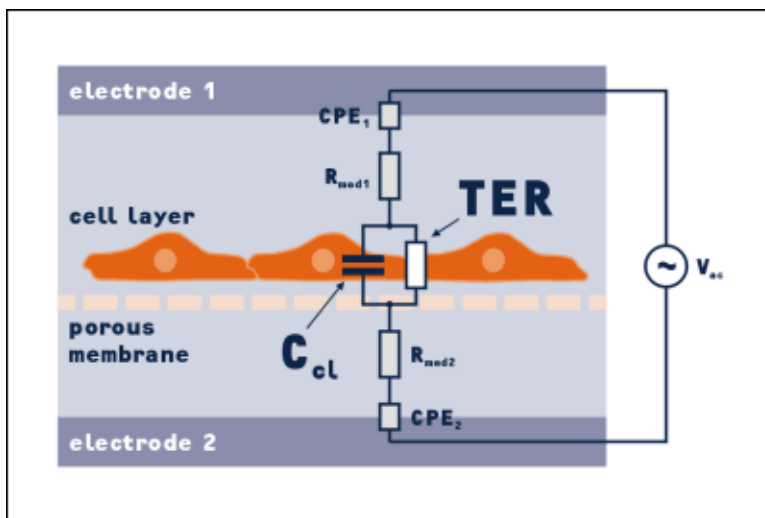


Figura 2. Esquema eléctrico para la medición de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) (API cells Inc., USA, 2014)

Se sembraron  $2,5 \times 10^5$  cel/mL de Caco-2 sobre la cámara apical del inserto transwells (Figura 3). Se realizó el recambio del medio de cultivo DMEM suplementado cada 2 días y seguidamente se midió el valor de TER. La incubación celular se extendió el tiempo suficiente (alrededor de 15 días) para lograr que las uniones estrechas se establezcan plenamente, obteniéndose un valor de TER constante (aproximadamente  $TER \geq 550 \text{ }\Omega\text{cm}^2$ ). Luego se realizó el ensayo de incubación con las diferentes muestras en DMEM Adhesión (Sección 4.3).

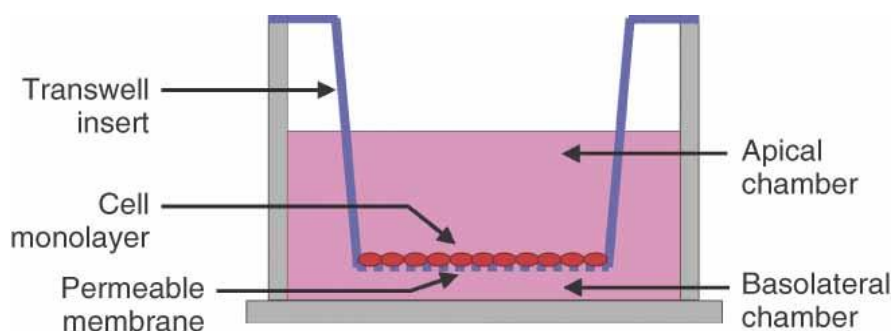


Figura 3. Descripción del sistema Inserto-transwell (Cell Health Series By McKenna Gordon, 2014)

## **8.2 Ensayo de transporte transepitelial peptídico**

Las monocapa de células epiteliales epitelial forman una interfase selectivamente permeable entre los compartimientos apical y basolateral para los diferentes compuestos químicos, controlando la difusión paracelular y el transporte transcelular. Este proceso está garantizado por la formación de las uniones estrechas intercelulares (tight junctions). Por lo que se estudió la traslocación peptídica paracelular y/o transcelular desde la cámara apical (superior) a la basolateral (inferior) en el modelo de inserto transwells, mediante el empleo de células epiteliales Caco-2 polarizadas, conformando una monocapa de células confluentes que dividen ambos compartimientos.

La línea celular Caco-2 presenta transportadores de membrana transcelular de oligopéptidos, en especial nos interesó PepT1 que se expresa constitutivamente (Sección 1.2) (Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008) (Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012) (Adibi 1997).

Se prepararon los muestras peptídicas P1, P2, P3, P5 y Gly-Sar en DMEM Adhesión (pH= 7,4) a una concentración de 200 µg/mL, con y sin agregado del activador FliC (1,5 µg/mL). Además se prepararon las combinaciones de a pares en DMEM de Adhesión, conteniendo Gly-Sar (200 µg/mL) con el agregado de cada uno de los péptidos P1 a P5 (200 µg/mL), y adicionando el activador FliC (1,5 µg/mL). Parte de cada una de las muestras se guardó a -80°C, denominada muestra Inicial. La parte restante fue incubada en la cámara apical del inserto transwells (400 µL para placa de 24 fosas o 1,5 mL para placa de 6 fosas), por 4 hs a 37°C en estufa con 5% CO<sub>2</sub>. Conjuntamente en la cámara basolateral se incubó solo con DMEM Adhesión (600 µL para placa de 24 fosas o 2,2 mL para placa de 6 fosas). Transcurrido el tiempo de incubación, se recolectaron los sobrenadantes de la cámara apical y basolateral, identificadas como muestra Apical y Basolateral, respectivamente. Se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

Se realizó el ensayo con y sin el agregado de FliC (1,5 µg/mL) en las muestras, debido a que la activación celular podría provocar un aumento en el número de transportadores de oligopéptidos presentes en membrana y/o hacerlos más afín a los péptidos. Otra posibilidad sería el aumento en la permeabilidad peptídica vía paracelular por el cambio en la expresión de proteínas que conforman las uniones estrechas (occludinas, claudinas, ZO-1, etc.).

Se utilizó el péptido P5 (KPV) como Control (+) debido a que utiliza al transportador PepT1 como vía de ingreso al citoplasma, induciendo luego un efecto inmunomodulador intra-citoplasmático (Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008). Mientras que el péptido Gly-Sar se utilizó como Control (-) debido a que posee una elevada afinidad por el mismo transportador, compitiendo por el sitio de unión con los demás péptidos, pero carece de poder inmunomodulador (Bettenworth, Buyse et al. 2011).

### 8.3 Determinación porcentual de los péptidos por RP-HPLC

Las muestras Inicial, Apical y Basolateral fueron filtradas a través de membranas de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore, Brasil). Posteriormente se les realizaron cromatografías por RP-HPLC a través de una columna analítica Sephasil Peptide C8, 12 µm ST 4,6/250 (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden). Procediendo luego según el protocolo descrito en el Capito 1, sección 3.2.6.5.

Los patrones usados fueron Gly-TYR (MW = 238,2), VAL-TYR-VAL (MW = 379,5), Methionine Enkephalin Acetate (TYR-GLY-GLY-PHE-MET, MW = 573,7), Leucine Enkephalin, (TYR-GLY-GLY-PHE-LEU, MW = 555,6), Angiotensin II Acetate (ASP-ARG-VAL-TYR-ILE-HIS-PRO-PHE, MW = 1046,2) (Sigma - Aldrich Inc., USA).

Se utilizó el programa Peak Fit software V4.12 ((SeaSolve Software Inc., India) para realizar la deconvolución del área bajo la curva de cada pico de elución, correspondientes a los péptidos P1, P2, P3 y P5. Determinando el porcentaje de las muestras Apical y Basolateral, respecto al Inicial.

## 9. Determinación de la quimioquina CCL20

Se plantearon dos tipos de esquemas como tratamientos inmunomoduladores: **Pre-tratamientos** en los que las muestras de amaranto se administraron previamente a la activación de las células con FliC y **Tratamientos simultáneos** donde las muestras se administraron en forma conjunta con FliC.

## **9.1 Dosaje de actividad enzimática luciferasa**

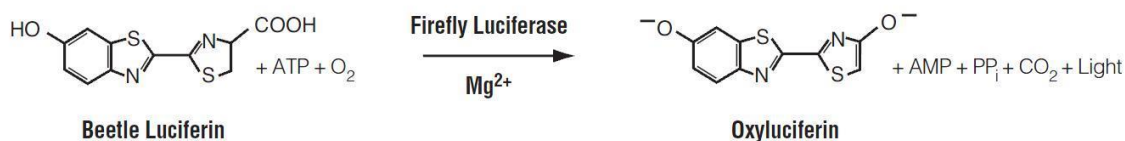
Se estudió el efecto modulador que ejercen las muestras de amaranto sobre el activador (FliC) de la respuesta inmune innata. Se realizó un ensayo indirecto que mide la expresión de la citoquina proinflamatoria CCL20 a través de la cuantificación de la actividad enzimática luciferasa, en células Caco-2 ccl20:luc (Sección 1.6).

Las células de la línea Caco-2 ccl20:luc se sembraron ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) en placas de 48 fosas. Luego de llegar a confluencia, se realizaron pre-tratamientos o tratamientos simultáneos con el activador (FliC). En el tratamiento simultaneo, las muestras se incubaron en conjunto con FliC (1,5 µg/mL) por 4 hs en estufa a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Mientras en el caso del pre-tratamiento, las muestras se incubaron por 1h y 2 h, luego se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron con PBS, y se incubaron con FliC (1,5 µg/mL) por 4hs en estufa a 37 °C en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

La flagelina fue calentada a 80° C durante 5 min para evitar posibles agregados. El tiempo de incubación de 4 hs es el requerido para la síntesis intra-citoplasmática de la enzima luciferasa. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó 2 veces la monocapa celular con PBS. Luego se agregaron 200 µL/fosa del buffer lisis CCLR (Cell Culture Lysis Reagent) (Tris-fosfato 25mM, DTT2mM, ácido tetra acético 1,2- diaminociclohexano, 10% glicerol y 1% Tritón X-100) del kit comercial Luciferase Assay Systems (Promega Co., USA), seguido de agitación sin formación de burbujas, para favorecer la ruptura celular.

Como Control (-) se realizaron incubaciones de las muestras sin el agregado del agonista FliC, con el objetivo de descartar posibles procesos pro-inflamatorios desencadenados por los componentes peptídicos de las mismas.

Se tomaron 8 µL del lisado y se agregaron 40µL del sustrato comercial LAR (Luciferase Assay Reagent), perteneciente al kit comercial Luciferase Assay Systems (Promega Co., USA). Se dejó actuar por 20 seg a 25 °C en oscuridad y se determinó la actividad de la enzima luciferasa por emisión de luz empleando un luminómetro Labsystem Luminoscan TL Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), utilizando 1 seg como tiempo de integración (Figura 4).



**Figura 4. Reacción de bioluminiscencia catalizada por la enzima luciferasa de luciérnaga**

Los resultados se expresaron como la luminiscencia normalizada porcentual (% normalized average luminescence, % NAL):

$$\% \text{ NAL} = L_m / L_{(+)} \times 100$$

$L_m$  = luminiscencia de las muestras de interés.

$L_{(+)}$  = luminiscencia del Control (+).

Control (-): muestras incubadas solo con DMEM de Adhesión (nivel basal).

Control (+): muestras incubadas con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión.

## 9.2 Evaluación de la expresión de mRNA CCL20 por Real Time PCR (qPCR)

Con el objetivo de investigar si las muestras de amaranto generaban modulación de la activación celular, se realizaron tratamientos simultáneos con FliC, midiendo la expresión relativa de mRNA de la quimioquina pro-inflamatoria CCL20.

Para ello se extrajo el mRNA, se obtuvo el cDNA por transcriptasa reversa y finalmente se cuantificó la expresión del gen CCL20 por PCR en tiempo real (qPCR, quantitative polymerase chain reaction).

La línea celular Caco-2 fue activada en tratamiento simultáneo con FliC (1,5 µg/mL). La incubación con las muestras se realizó por un intervalo de 2 hs. Como Control Interno para normalizar la cantidad de DNA, se midió la expresión de mRNA de β-actina. El incremento de mRNA se calculó por comparación con el grupo Control (-) (solo con DMEM Adhesión).

### 9.2.1 Extracción de RNA total

Para la obtención de ARN total se utilizó el kit comercial RNAspin mini isolation (GE Healthcare, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El crecimiento de la línea celular Caco-2 se realizó en placas de 48 fosas hasta llegar a confluencia. Posteriormente se dio inicio al ensayo de modulación con la incubación de las muestras por un período de 2 hs. Transcurrido el lapso, se descartó el sobrenadante celular, se agregó 350  $\mu$ L de buffer de lisis RA1 con 3,5  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y se homogenizó. Luego al lisado obtenido se le agregó 350  $\mu$ L de etanol 70% y se eluyó en columna provista por el kit haciendo uso de una en microcentrífuga (Microcentrífuga IEC Micromax, Thermo, USA) a 8000 xg durante 30 seg a 25 °C, uniendo el RNA a la membrana de sílica de la columna. Posteriormente se agregó 350  $\mu$ L de buffer de desalinización (MDB) y se centrifugó a 11000 xg durante 1 min a 25 °C.

El ADN que podría llegar a interferir se eliminó por agregado de 95  $\mu$ L de buffer DNAsa recombinante a 25 °C durante 15 min. Luego se inactivó la DNAsa con 200  $\mu$ L de buffer RA2 y se centrifugó a 11000 xg por 1 min a 25 °C.

Posteriormente se lavó la columna con 600  $\mu$ L de buffer RA3 y se centrifugó a 11000 xg por 1 min a 25 °C. Luego se realizó otro lavado con 250  $\mu$ L del mismo buffer RA3 y se centrifugó a 11000 xg durante 2 min a 25 °C. El objetivo de estos 3 lavados es eliminar las sales y restos celulares. En todos los casos se utilizó la microcentrífuga indicada previamente.

Finalmente, se colocó la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y la elución del ARN se llevó a cabo por agregado de 60  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de RNAsa y centrifugación a 11000 xg por 1 min a 25 °C. La muestra eluida de RNA se conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

Para cuantificar y determinar la calidad del RNA extraído se empleó un método espectrofotométrico, en el cual se midió la absorbancia (Abs) a 260 y a 280 nm. Una relación  $Abs_{260}/Abs_{280}$  entre 1,7 y 2,0 indica un grado de pureza aceptable, mientras que valores menores nos señalan una contaminación con proteínas, y valores mayores, con DNA. Para cuantificar el RNA se midió la  $Abs_{260}$  y se consideró una unidad de absorbancia equivalente a 40  $\mu$ g/mL de RNA.

$$[RNA] = Abs_{260} \times \text{dilución} \times 40 \mu\text{g/mL}$$

### 9.2.2 Retrotranscripción

Esta técnica se basó en la obtención de DNA complementario (cDNA) a partir del RNA mensajero (mRNA) (Mullis 1990), utilizando la enzima Transcriptasa reversa (M-MLV).

Para la transcripción reversa se utilizó el siguiente protocolo por muestra:

Se preparó 1 µg de RNA total, 1 µL de Random primers (10µg/µL) y se llevó a volumen de 12 µL con H<sub>2</sub>O libre de RNAasa. La mezcla se calentó a 70 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA e inmediatamente se enfrió a 4 °C para lograr la hibridación de los primers. Luego se agregó la premezcla que consistió en 4 µL de buffer transcriptasa reversa, 1,5 µL de DTT 100 mM, 0,5 µL de inhibidor de nucleasas de RNA, 1 µL de dNTPs y 1 µL de la enzima M-MLV Transcriptasa reversa (Invitrogen, Life Technologies, USA).

Luego las muestras se incubaron en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, USA) con el siguiente programa de reacción: 45 min a 37°C seguido por 15 min a 70°C y luego enfriadas a 4°C. El cDNA obtenido fue guardado a -20°C hasta su posterior uso.

### 9.2.3 Real Time PCR (qPCR)

Se utilizó una sucesión de ciclos, que comenzó con la desnaturalización de la doble hebra de ADN, seguido con la hibridación de los primers al ADN molde y a continuación la síntesis de la cadena complementaria mediante una enzima polimerasa resistente al calor (Taq DNA polimerasa); para luego recomenzar el ciclo.

En cada ciclo la cantidad de ADN se duplicó, y en condiciones ideales (eficiencia del 100%), en un ciclo dado (n), el número de copias de ADN ( $N_n$ ) puede calcularse como  $N_n = N_0 \times 2^n$ , donde  $N_0$  es el número de copias inicial. El número de copias de ADN crece en forma exponencial hasta que los reactivos se agotan y/o se produce inhibición por acumulación de producto.

La qPCR se llevó a cabo en un termociclador iCycler Thermal (iCycler Thermal Cycler 170-8731, BioRad, USA) que posee acoplado un detector óptico que registra la fluorescencia en cada ciclo y en cada reacción individual.

Se utilizó el kit comercial SYBRGreen ER qPCR SuperMixfor iCycler (Invitrogen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Consistió en el agregado para cada fosa: 1 µL



Primer Forward, 1  $\mu\text{L}$  Primer Reverse, 10  $\mu\text{L}$  de la dilución 1/20 de cDNA en  $\text{H}_2\text{O}$  y 12,5  $\mu\text{L}$  SYBRGreen. Se programó el siguiente ciclado térmico:

Paso 1: 2 min a 50 °C, 1 ciclo.

Paso 2: 8 min 30 seg a 95 °C, 1 ciclo.

Paso 3: 15 seg a 95 °C, 1 min a 60 °C a, 40 ciclos.

El indicador SYBRGreen se une al ADN de doble cadena, fluoresciendo en color verde cuando es excitado con luz azul o UV, detectándose la amplificación en tiempo real.

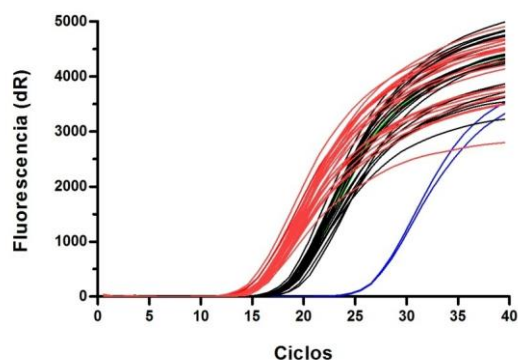
De esta manera, se obtiene para cada reacción individual una curva de amplificación, que se define como la curva de fluorescencia en función del número de ciclos, dando una curva sigmoidea, en la cual se establecen 3 fases: inicial, exponencial y la última fase de meseta o declinación (Figura 5). Se deduce que cuanto mayor sea la cantidad de ADN inicial, más pronto se observará un aumento de la fluorescencia en el curso de los ciclos de reacción.

Se determinó:

**Línea de Base:** se define como la fluorescencia basal. Es el valor de amplificación que permanece constante en el transcurso de los ciclos, se determina en la fase inicial.

**Línea umbral:** se define como el nivel fijado en la zona exponencial de la curva. Es significativamente superior a la línea de base y está determinada en forma estadística por el software iQ5 Optical System Software 2.0 (Bio-Rad Lab., USA).

**Ciclo umbral ( $C_T$ ):** ciclo en que la fluorescencia de la muestra supera la línea umbral. Se calcula en forma logarítmica y se utiliza para la cuantificación relativa de la expresión genética.



**Figura 5. Curva de amplificación.** Consiste en una curva sigmoidea de fluorescencia en función del número de ciclos.

**Modelo  $C_T$  comparativo:** se realizó una cuantificación relativa de la expresión del gen, debido a que se compara con otro de referencia, en nuestro caso el correspondiente a la  $\beta$ -actina, ya que es un gen endógeno de expresión constante (gen de control interno) en las condiciones de ensayo. El objetivo es corregir las diferencias de expresión, relacionadas con las distintas cantidades de RNA total de las muestras. Se hace la suposición de que la eficiencia de amplificación es del 100% para ambos genes.

Se graficó los valores de Incremento relativo (FI) de los niveles de mRNA ( $\Delta\Delta Ct$ ) de la citoquina CCL20 para cada muestra:

$$\Delta Ct_m = Ct_m - Ct_{m \text{ blanco}}$$

$$\Delta Ct_{ref} = Ct_{ref} - Ct_{ref \text{ blanco}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_{ref}$$

$$FI = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$Ct_m$  = Ct de CCL20 obtenido luego del tratamiento con la muestra.

$Ct_{m \text{ blanco}}$  = Ct de CCL20 sin tratar.

$Ct_{ref}$  = Ct de  $\beta$ -actina obtenido luego del tratamiento con la muestra.

$Ct_{ref \text{ blanco}}$  = Ct de  $\beta$ -actina sin tratar

Secuencia de los primers humanos de CCL20 utilizados para la amplificación:

**Fwd CCL20:** CCA AGA GTT TGC TCC TGG C

**Rv CCL20:** TGC TTG CTG CTT CTG ATT CG

### 9.3 Dosaje de CCL20 en sobrenadante celular por ELISA Indirecto

Los cultivos celulares de Caco-2 se realizaron en placas de 48 fosas (Cell Star®, GBO, USA). Se incubaron 250  $\mu$ L de la suspensión celular ( $2,5 \times 10^5$  células/mL) en DMEM suplementado hasta llegar a confluencia. Posteriormente se realizaron ensayos de tratamiento en simultáneo con FliC, incubando las muestras de interés por 8 hs a 37 °C en atmósfera controlada al 5% CO<sub>2</sub>. Luego se extrajo el sobrenadante celular y se congeló a -80 °C hasta su posterior uso.

La cuantificación de la quimioquina CCL20 se realizó por la técnica de ELISA de captura tipo sándwich, mediante el uso del kit comercial Human CCL20/MIP-3 $\alpha$  (R&D Systems, Inc., USA).

Este inmunoensayo consistió en la sensibilización de las placas de ELISA (F8 Maxisorp Nunc- Inmuno module, Thermo Scientific Nunc, USA) con 100  $\mu$ L/fosa del anticuerpo de captura anti-CCL20 a una concentración de 2  $\mu$ g/mL en PBS a pH= 7,4 durante toda la noche a 4 °C en humedad controlada. Luego se realizó el bloqueo con 200  $\mu$ L/fosa del reactivo diluyente (PBS con seroalbúmina bovina (BSA) 1%, pH= 7,4) durante 1 h a 37°C y se prosiguió con 3 lavados de PBS Tween 0,05 %. Posteriormente se incubaron durante toda la noche a 4 °C con 100  $\mu$ L/fosa del sobrenadante celular de las muestras, y paralelamente con 100  $\mu$ L/fosa de los estándares de quimioquina CCL20 del kit Human CCL20/MIP-3 $\alpha$  para la curva de calibración. Luego de 3 lavados consecutivos, se incubó con 100  $\mu$ L/fosa del anticuerpo de detección Anti-CCL20 biotinilado (0,2  $\mu$ g/mL), durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se realizó una incubación de 100  $\mu$ L/fosa de Streptavidina-HRP (0,15  $\mu$ g/mL) por 30 min a 37°C en oscuridad. A continuación se agregaron 100  $\mu$ L de solución de 1 mg/mL de OPD y 0,1  $\mu$ L/mL de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato cromógeno en buffer citrato 0,1 M pH= 5,0. Se detuvo la reacción a los 15 min con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se midió la Abs a 492 nm. La concentración de quimioquinas en el sobrenadante de cultivo se obtuvo de la curva de calibración (Abs vs. concentración de quimioquinas (ng/mL)).

## **10. Modelo murino de alergia alimentaria**

El esquema general de inmunización empleado fue el optimizado en la tesis doctoral de la Dra. Paola Smaldini (Smaldini, Curciarello et al. 2012). Se decidió evaluar las propiedades inmunomodulatorias del péptido P2 (SSEDIKE) en condiciones proinflamatorias circunscriptas a un escenario biológico en el cual se ve afectada la mucosa gastrointestinal.

### **10.1 Agente inmunógeno**

Se empleó como agente inmunógeno a las proteínas de leche de vaca (PLV) contenidas en leche descremada comercial en polvo (Svelty, Nestle, Arg.). Se prepararon soluciones en distintos buffers: en PBS a pH= 7,4, en 3%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH= 7,8 y en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada. Se agitó la muestra de PLV hasta lograr disolución.

### **10.2 Adyuvante mucosal**

Se empleó la toxina colérica (TC) de *Vibrio cholerae* (Sigma Aldrich Inc., USA) en buffer 3%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH= 7,8.

### **10.3 Agente inmunomodulador**

Se empleó el péptido P2 (SSEDIKE), secuencia proveniente de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus*, sintetizado por ChinaPeptides (Shanghai, China). Se prepararon soluciones en buffer 3%  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH= 7,8. La obtención, secuenciación y síntesis peptídica se describen en el Capítulo I.

### **10.4 Animales de laboratorio**

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 4-6 semanas de edad, libres de patógenos, procedentes del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). El traslado de los ratones se realizó 7 días antes de comenzados los protocolos de experimentación al bioterio del Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP) ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas de Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Consta de un sistema controlado de barreras sanitarias para evitar contaminaciones cruzadas y externas. Los procedimientos durante la totalidad de los ensayos se efectuaron de acuerdo a las normas internacionales para el trabajo con animales de experimentación.

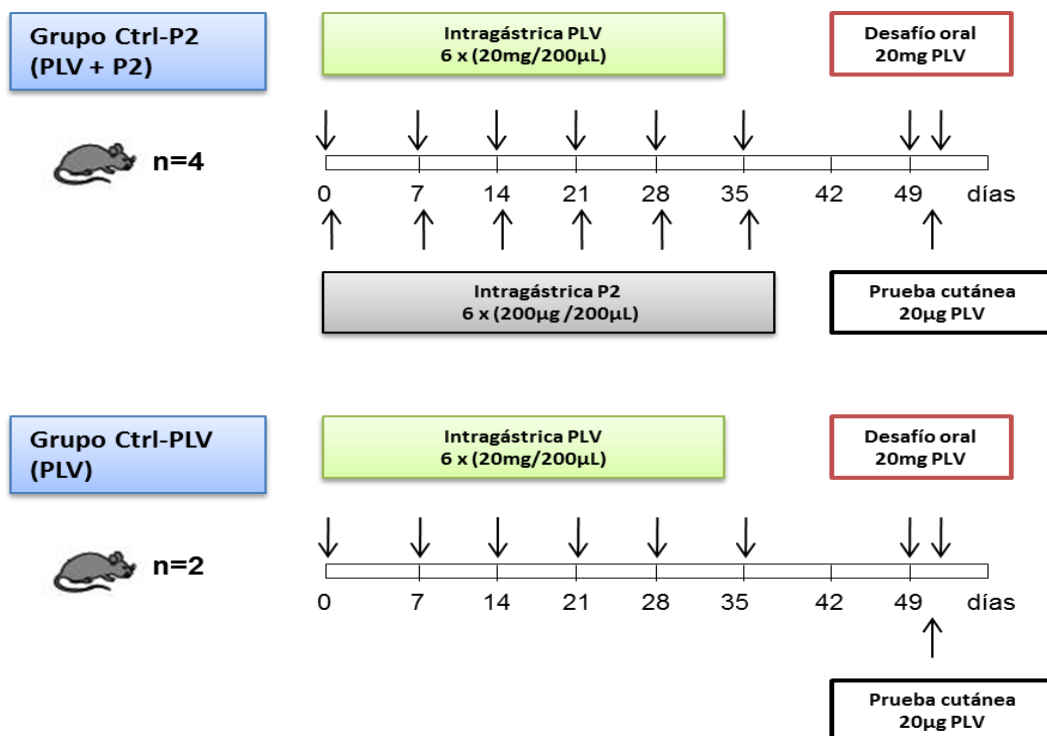
Cada grupo experimental consistió en 5 ratones. Los animales se mantuvieron en jaulas plásticas, con ciclo día/noche controlados, ambiente con temperatura controlada entre

18°C y 24°C, con disponibilidad de H<sub>2</sub>O y alimento estériles *ad libitum*. El alimento balanceado (Cooperación para rata y ratón, Cooperativas Argentinas, Argentina) se compone de proteína bruta (mínimo) 10%, extracto etéreo (mínimo) 5%, fibra cruda (máximo) 6%, minerales totales (máximo) 10%, calcio 1,3%, fósforo (disponible) 0,8%, humedad (máxima) 12%. Este alimento no contiene en su composición proteínas de leche de vaca (PLV).

### 10.5 Protocolo de modulación en modelo murino de alergia alimentaria a PLV

Se realizó el tratamiento inmunomodulatorio con P2 en forma simultánea a la sensibilización alérgica (TC junto a PLV). Consistió en la administración intragástrica (ig) del antígeno PLV junto al adyuvante TC, una vez por semana durante 6 semanas. Al día posterior a la sensibilización, se aplicó el tratamiento con P2 por vía ig.

En el esquema de la Figura 6 se muestra el protocolo experimental con los respectivos controles.



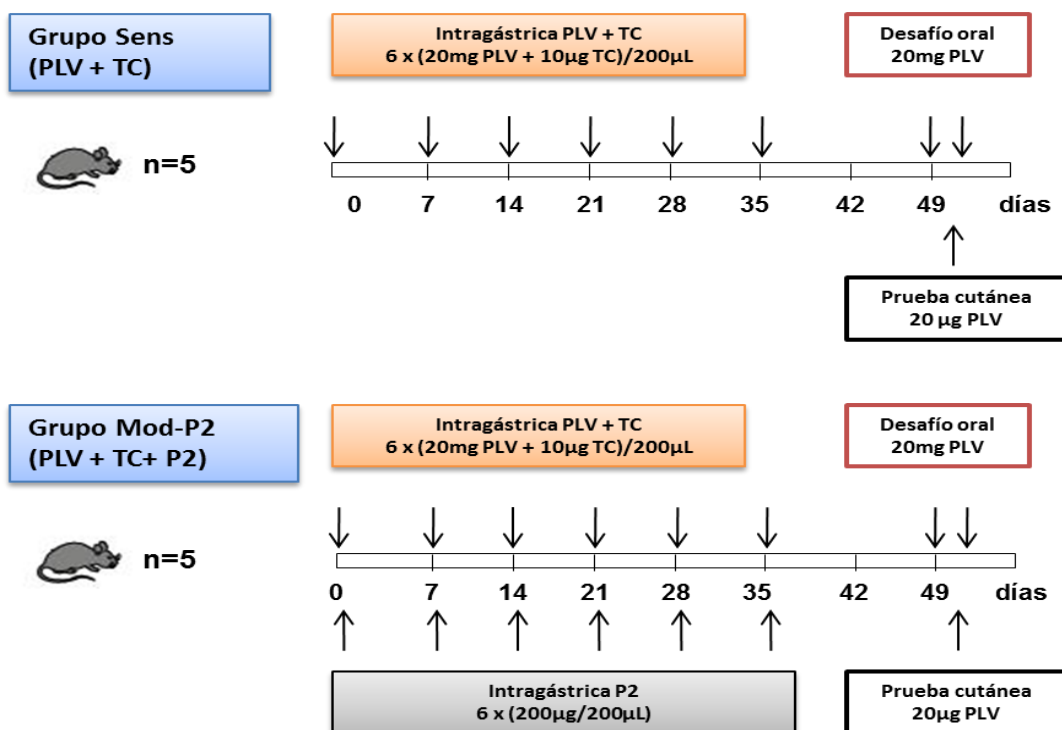


Figura 6. Esquema general de sensibilización e inmunomodulación con P2, aplicado al modelo murino de alergia alimentaria a PLV.

La administración de las dosis ig se realizó mediante una sonda metálica. Con el objetivo de disminuir la acidez estomacal, previamente (30 min) a la administración de las muestras, se suministró 200 µL del buffer  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  3% a pH= 7,8; el cual fue también utilizado para disolver las mismas. Este procedimiento permite evitar la hidrólisis ácida y la consiguiente degradación. Los ratones se mantuvieron en ayunas por 2 hs, antes y después de cada administración, para lograr una mayor absorción intestinal.

Se agruparon los ratones en 4 grupos: Ctrl-P2, Ctrl-PLV, Sens, Mod-P2:

**1) Grupo Control PLV (Ctrl-PLV):**

- PLV (20 mg/dosis). Día (n).

**2) Grupo Control P2 (Ctrl-P2):**

- PLV (20 mg/dosis). Día (n).
- P2 (200 µg/dosis). Día (n+1).

**3) Grupo Sensibilizado (Sens):**

- PLV (20 mg/dosis) + TC (10 µg/dosis). **Día (n).**

**4) Grupo Modulado (Mod-P2):**

- PLV (20 mg/dosis) + TC (10 µg/dosis). **Día (n).**
- P2 (200 µg/dosis). **Día (n+1).**

Día (n): Corresponde a los días: 0, 7, 14, 21, 28 y 35

Día (n+1): Corresponde a los días: 1, 8, 15, 22, 29 y 36

A cada ratón de los grupos Ctrl-P2 y Mod-P2, se le administró una dosis semanal (n+1) de **P2** (200 µg/dosis) por 6 semanas (total= 1,2 mg/ratón).

A cada ratón de los grupos Sens y Mod-P2, se le administró una dosis semanal (n) de **TC** (10 µg/dosis) durante 6 semanas (total= 60 µg/ratón).

A cada ratón de todos los grupos, se les administró una dosis semanal (n) de **PLV** (20 mg/dosis) durante 6 semanas (total= 120 mg/ratón).

Desafío oral: se administró por vía ig de PLV (20 mg/dosis), día 49 y 51.

Prueba cutánea: día 50.

## **11. Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas *in vivo***

### **11.1 Signos clínicos post-desafío oral (DO)**

Se realizaron 2 desafíos orales por vía ig únicamente con PLV (20mg/dosis), a los 10 y 12 días posteriores a la culminación del plan de inmunización (día 49 y 51). Con el objetivo de analizar los signos clínicos locales y sistémicos, inducidos como consecuencia de la sensibilización previa, mediada por IgE.

Los signos clínicos aparecen entre 15 y 30 min posteriores a la exposición a PLV y alcanzan un pico máximo aproximado a los 60 min después de la aparición del primer síntoma. Los animales se observaron durante un tiempo total de 90 min.

Se definió una escala semi-cuantitativa de signos clínicos, asignándose puntaje numéricos (0 a 5) según la gravedad de los mismos, siendo 0 sin síntomas y 5 la muerte del animal (Tabla 2). En cada animal se acumularon los puntajes en base a la aparición secuencial o simultánea de los diferentes síntomas, cabe aclarar que no se observó la muerte de los mismos porque no se trata de un modelo experimental de anafilaxia. Los signos clínicos fueron observados por 2 investigadores independientes a ciegas, es decir que desconocían a qué grupo pertenecía cada animal (identificado individualmente por un número).

**Tabla 2. Escala de puntaje o score utilizada para caracterizar la intensidad de los signos clínicos inducidos luego del desafío oral, en los animales de los diferentes grupos.**

Puntaje	Signos clínicos observados
0	Sin síntomas
1	Rascarse y frotarse alrededor de la nariz y la cabeza Enrojecimiento en la misma zona
2	Hinchazón alrededor de los ojos y la boca Diarrea Pelo erizado Reducción de la actividad general con/ sin aumento de la frecuencia respiratoria
3	Respiración dificultosa Cianosis alrededor de la boca y la cola
4	Ausencia de actividad general después de un estímulo Temblores, convulsiones
5	Muerte

## 11.2 Prueba cutánea en almohadilla plantar (PC)

Se evaluó la presencia de IgE específica unida a receptores de alta afinidad en la superficie de los mastocitos de la piel de los animales, a través de la inoculación por vía subcutánea (sc) de PLV y por vía intravenosa (iv) del colorante Azul de Evans.

Si el animal sensibilizado tiene anticuerpos IgE específicos en las células, la presencia del antígeno induce la activación celular con la consiguiente liberación de mediadores pro-inflamatorios preformados en los gránulos citoplasmáticos de los mastocitos. La zona



inflamada se evidencia experimentalmente por la extravasación de Azul de Evans de la circulación hacia el tejido circundante en minutos (coloración azul de la piel).

Los ratones se inocularon por vía sc en la almohadilla plantar trasera derecha con 20 µg de PLV en 20 µL SF (1 mg/mL) y en la almohadilla plantar trasera izquierda con 20 µL SF, como control negativo. Inmediatamente después de la inyección sc se procedió a la inoculación iv de la cola con 100 µL de Azul de Evans al 0,10%. La presencia de color azul en la zona de inoculación del antígeno a los 15-30 min, se consideró como prueba positiva.

## **12. Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas *in vitro***

### **12.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral**

Se midieron en el suero proveniente de los animales de cada grupo, los niveles séricos de distintos isotipos de anticuerpos específicos para PLV, mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos (EAST, ELISA indirecto). Como controles negativos se emplearon sueros de animales no sensibilizados o se omitió el anticuerpo primario (suero de los animales en este caso).

#### **12.1.1 Determinación sérica de IgE específicos por EAST**

La determinación sérica de anticuerpos IgE específicos se realizó por el método de EAST (Enzyme Attached Sorbent Test), para lo cual se preparó la fase sólida según el protocolo descrito por Ceska (Ceska 1981).

Activación de los papeles con CNBr: Como fase sólida se utilizaron discos de papel de filtro de celulosa (*Whatman*) con un diámetro de 5 mm. Para su activación se sumergieron 20 g de papel en una solución de 20 g CNBr en 500 mL H<sub>2</sub>O destilada, luego se llevaron a pH= 10,5 con NaOH 1 M, posteriormente se les realizaron lavados sucesivos con las soluciones de NaHCO<sub>3</sub> 0,005 M, H<sub>2</sub>O destilada, acetona 25 %, acetona 50 %, acetona 75 %, y acetona 100 %. Finalmente los discos de papel se secaron a 25 °C y se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

Reacción inmunológica: para la determinación de IgE específica en suero de ratón, se emplearon los discos de papel recientemente activados, y se sensibilizaron con 1,75 mg/mL de PLV en buffer 0,1 M carbonato/ bicarbonato pH= 9,4 durante toda la noche a 25 °C. Luego se lavaron con buffer de sensibilización (buffer 0,1 M carbonato/ bicarbonato pH= 9,4) y se bloquearon con una solución 0,05 M de etanolamina durante 2 hs en agitación a 25 °C. Finalmente se guardaron en la heladera en PBS con azida sódica hasta su utilización.

Cada disco de celulosa sensibilizado y bloqueado, se incubó con 50 µL de suero de ratón sin diluir durante toda la noche a 4°C. Luego se lavaron con PBS Tween 0,05%, se incubaron con 50 µL del anticuerpo biotinilado anti-IgE de ratón (BD Pharmigen, USA, 1:750) llevado a una concentración de 0,67 µg/mL con diluyente de suero equino 3% en solución fisiológica (SE 3% v/v en SF), durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron los discos y se incubaron con streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (FAL) ((Sigma - Aldrich Inc., USA) (1:3000) durante 30 min a 37°C. Finalmente se agregó la solución de p-nitrofenilfosfato de sodio (PNPP), deteniéndose la reacción aproximadamente a los 20 min con 100 µL de EDTA 0,1 M. Se midió la DO a 405 nm en el lector de ELISA Sirio SAECS (Radim Company, Italia).

### **12.1.2 Determinación sérica de IgG1 e IgG2a por ELISA Indirecto**

Los isotipos de IgG1 y IgG2 específicos se determinaron por método de ELISA indirecto, para lo cual se sensibilizaron las placas de microelisa de poliestireno (F8 Maxisorp Nunc-Inmuno module, Thermo Scientific Nunc, USA) con el antígeno PLV a una concentración de 1 µg/100 µL de buffer de sensibilización (buffer 0,1 M carbonato/ bicarbonato pH= 9,4) por fosa, durante toda la noche a 4 °C. Luego de lavados sucesivos con PBS Tween 0,05%, se bloquearon con suero equino al 5% en solución fisiológica (SE 5% v/v en SF) por 1 h a 37 °C, y posteriormente se incubaron con 100 µL de suero de ratón diluido 1:200 en el diluyente de SE 5% v/v en SF por 1 h a 37°C. Luego de 3 lavados consecutivos, se incubaron con el anticuerpo secundario específico de IgG1 obtenido en oveja (Dako), en una dilución 1:2000 en diluyente SE 5% v/v en SF, durante 1 h a 37°C. Finalmente, tras 3 lavados, se empleó un suero policlonal obtenido en cabra específico de gammaglobulina de oveja conjugado a peroxidasa (HRP) (Jackson), dilución 1:10000 en diluyente, durante 1 h a 37°C.

Paralelamente se incubó con el anticuerpo secundario específico de IgG2a de ratón obtenido en oveja (Dako) conjugado con HRP (Jackson) en una dilución 1:3000 en diluyente SE 5% durante 1 h a 37°C.

Por último, se agregaron 100 µL de solución de sustrato 1 mg/mL de OPD y 0,1 µL/mL de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato cromógeno en buffer citrato 0,1 M pH= 5,0. Se detuvo la reacción a los 15 min con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Se midió la DO a 492 nm en el lector de ELISA Sirio SAECS.

## **12.2 Evaluación de la respuesta inmune celular**

### **12.2.1 Dosaje de la expresión de mRNA CCL20 por qPCR**

El día posterior al desafío oral con PLV, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo la primera porción del intestino y se estudió la expresión del gen de la quimioquina CCL20.

Para la obtención de RNA total, las muestras se trataron con buffer lisis del kit comercial Illustra RNAspin mini isolation (GE Healthcare, Germany) y se homogeneizaron mecánicamente mediante el empleo de un homogeneizador UltraTurrax (Ultraturrax IKA T10B basic, IKA, USA). Los pasos siguientes, correspondientes a la extracción de mRNA, la transcripción a cDNA y su amplificación por Real Time PCR, se detallaron en la Sección 9.2. Se graficaron los valores de Incremento relativo de mRNA (FI) de la citoquina CCL20.

### **12.2.2 Dosaje de citoquinas IL-5, IL-13 e IFN-γ por ELISA Indirecto**

El día posterior al desafío oral con PLV, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. El bazo de cada animal se disgregó mecánicamente hasta obtener una suspensión celular en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) con suero fetal bovino 5% estéril con antibióticos, y se realizó el recuento de células viables con Tripán Blue 1% v/v (Invitrogen, USA). Se centrifugó durante 5 min a 500 xg a 4 °C con microcentrífuga IEC (Micromax, Thermo, USA) y se suspendió el pellet celular en medio de cultivo RPMI estéril suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5% y antibióticos (estreptomomicina, penicilina) a razón de 8x10<sup>6</sup> células/mL.

Los cultivos celulares se realizaron en placas de cultivo celular de 48 fosas (*Cell Star*®, *GBO, USA*) en medio de cultivo RPMI suplementado con SFB 5% y antibióticos. Se colocaron 500  $\mu$ L de la suspensión celular ( $4 \times 10^6$  células/fosa) y 500  $\mu$ L de una solución 2X en RPMI con PLV (350  $\mu$ g/fosa). Como control negativo se empleó medio RPMI.

Luego de 72 hs de incubación a 37°C en atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la presencia de citoquinas mediante ELISA de captura indirecto de origen comercial: INF- $\gamma$  (*Mouse IFN- $\gamma$  CytoSet™, BioSource, Invitrogen, USA*), IL-5 (*Mouse IL-5 CytoSet™, BioSource, Invitrogen USA*) e IL-13 (*Mouse IL-13, R&D Systems, UK*). Se introdujeron algunas modificaciones técnicas al protocolo indicado por el fabricante para optimizar cada ensayo, en función de las concentraciones de citoquinas presentes en los sobrenadantes de los cultivos.

Este inmunoensayo, consistió en sensibilizar las placas de ELISA (F8 Maxisorp Nunc-Inmuno module, Thermo Scientific Nunc, USA) con 100  $\mu$ L/fosa del anticuerpo de captura correspondiente a cada citoquina, en una concentración de 1,25  $\mu$ g/mL para IL-5 e IFN- $\gamma$ , y 4  $\mu$ g/mL de IL-13 en buffer de sensibilización pH= 9,0, durante toda la noche a 4°C. Luego se realizó el bloqueo con 300  $\mu$ L/fosa de “Buffer Assay” (PBS con BSA 0,5%, pH= 7,4) durante 1 h a 37°C, posteriormente se realizaron 3 lavados y se incubó con 100  $\mu$ L/fosa de sobrenadante de cultivo durante toda la noche a 4 °C. Paralelamente se procesaron los estándar de citoquinas de cada kit para construir la curva de calibración, junto con 50  $\mu$ L/fosa del “anticuerpo de detección” (anti-IFN- $\gamma$ -biotinilado 0,125  $\mu$ g/mL, anti-IL-5 biotinilado 0,10  $\mu$ g/mL y anti-IL-13-biotinilado 0,0625  $\mu$ g/mL), incubando toda la noche a 4 °C.

Finalmente, se realizó una incubación con Streptavidina-HRP 0,15  $\mu$ g/mL de 1 h a 37 °C. Luego se agregaron 100  $\mu$ L de solución de sustrato 1 mg/mL de OPD y 0,1  $\mu$ L/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como sustrato cromógeno en buffer citrato 0,1 M pH= 5,0 y se detuvo la reacción a los 15 min con 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Se midió DO a 492 nm en el lector de ELISA Sirio SAECS. La concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo se obtuvo de la curva de calibración (DO vs. concentración de citoquinas en pg/mL).



# ***Capítulo I: Obtención y caracterización muestral***

---

# 1. Introducción

---

## 1.1 Proteínas de Amaranto

Las proteínas vegetales se agrupan dependiendo de su solubilidad en distintos solventes, de acuerdo a la clasificación de Osborne (Osborne 1924):

- Albúminas: solubles en H<sub>2</sub>O.
- Globulinas: solubles en soluciones salinas diluidas y neutras.
- Prolaminas: solubles en etanol o mezclas etanol-H<sub>2</sub>O.
- Glutelinas: solubles en soluciones alcalinas o ácidas.

Las proteínas contenidas en el grano del Amaranto están constituidas principalmente por albúminas que conforman alrededor del 40,0 - 66,9% del total, seguidas por las glutelinas 22,4 - 44,0%, luego por las globulinas 13,7 - 18,1% y por último las prolaminas que conforman del 1,0 - 11,0% del total de proteínas (Segura Nieto, Vázquez Sánchez et al. 1992). La amplitud en los porcentajes proteicos es consecuencia de las distintas condiciones experimentales utilizadas para su extracción. Estas proteínas presentan muy buen balance aminoacídico, con un contenido importante de lisina, triptófano y de aminoácidos azufrados (principalmente metionina), esenciales en la alimentación humana y que comúnmente son limitantes en los cereales (Andrásosfszky, Szöcs et al. 1998).

Las **globulinas** se caracterizan en dos tipos, dependiendo de su coeficiente de sedimentación, en 7S y 11S, existiendo un tercer tipo denominado globulina-P.

Las **globulinas-11S** poseen masas moleculares entre **300 - 360 kDa** (Marcone, Kakuda y col., 1998, Marcone, 1999). Están organizadas en hexámeros, que a su vez están formados por **subunidades** de masa molecular aproximada entre **50 - 70 kDa** unidas por interacciones no covalentes. Cada una de las subunidades, a su vez, está conformada por un **polipéptido ácido** de masa molecular aproximada de **30 kDa** y un **polipéptido básico** de alrededor de **20 kDa**. Estos polipéptidos se encuentran unidos por enlaces disulfuros

(Segura Nieto, Vazquez Sanchez et al. 1992). La estabilidad térmica de esta fracción es alta, su temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) es superior a 95 °C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Martínez and Añón 1996) (Castellani, Martínez et al. 2000) (Gorinstein, Zemser et al. 1996).

Las **globulinas-7S** poseen una masa molecular entre **150 - 200 kDa**, están organizadas en trímeros que no se encuentran unidos por puentes disulfuros. Se distinguen **dos tipos de subunidades** dentro de los trímeros, unas de masa molecular entre **70 - 90 kDa**, y otras de masa molecular de **50 kDa**. Ambos tipos de subunidades comparten una gran homología en su secuencia. Cada una de las subunidades, a su vez, está conformada por un gran número de **polipéptidos** de diferentes masas moleculares entre **15 - 90 kDa (90; 70,9; 40; 37,4; 35,2; 31,2; 23,6 y 15,2 kDa)**. La globulina-7S presenta una temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de 80,2 °C (De La Barba Rosa, Gueguen et al. 1992) (Martínez and Añón 1996) (Marcone 1999).

La **globulina-P** forma agregados de alto peso molecular (**600 - 1500 kDa**) (Castellani 2000) estabilizados por puentes disulfuros, mientras que una proporción minoritaria de las moléculas de globulina-P se encuentran libres, con una masa molecular de alrededor de **300 kDa**. Esta fracción proteica está conformada por **polipéptidos** de masas moleculares **56, 36, 31, 26 y 22 kDa**, semejantes a la composición de globulinas-11S, por lo que son incluida dentro del grupo de las globulinas, aunque su extracción sea similar a las de las albúminas (Konishi, Horikawa et al. 1991). La globulina-P posee una elevada estabilidad térmica ( $T_d$  de 94 °C) (Martínez, Castellani et al. 1997), y baja solubilidad debido a su alta capacidad de polimerización.

Las **albúminas** están compuesta por polipéptidos de masa molecular entre **10 - 43 kDa** (Segura-Nieto, Vázquez-Sánchez et al. 1992). En general son proteínas monoméricas y poseen baja estabilidad térmica ( $T_d$  de 64 °C) (Segura Nieto, Vázquez Sánchez et al. 1992, Martínez and Añón 1996).

Las **prolaminas** están compuestas por polipéptidos de baja masa molecular comprendidos entre **10 - 22 kDa** (Abugoch James 2006). Son solubles en isopropanol al 70%, por lo que se encuentran en baja cantidad en los aislados proteicos de Amaranto obtenidos por extracción isoeléctrica.



Las **glutelinas** son la fracción proteica más insoluble del Amaranto. Su extracción se realiza en condiciones de pH extremos (pH= 10), en presencia de detergentes como el SDS y agentes reductores (2-ME). En medio desnaturizante no reductor, se han determinado péptidos de masas moleculares entre **50 - 67 kDa, 30 - 38 kDa y 20 - 28 kDa**, además de subunidades agregadas de masas moleculares superiores a 100 kDa. En medio reductor (2-ME) se han detectado especies de masa molecular semejante a las de las globulinas de **54 - 60 kDa, 35 - 38 kDa y 24 - 26 kDa**, con disminución en la cantidad de polipéptidos agregados (Gorinstein, Moshe et al. 1991, De La Barba Rosa, Gueguen et al. 1992).

## 1.2 Grado de hidrólisis (%Gh)

El grado de hidrólisis (%Gh) es el parámetro utilizado para medir la extensión de la hidrólisis en una reacción de proteólisis, y representa la proporción de enlaces hidrolizados con respecto al total. Debido a la ruptura de los enlaces peptídicos, se liberan grupos  $\alpha$ -amino a los que se une específicamente el reactivo ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) (Sección 2.2) (Adler-Nissen 1979), derivando en productos que son detectados por espectrofotometría.

A partir del grado de hidrólisis es posible estimar la longitud de péptido promedio (L) de los hidrolizados (Adler-Nissen 1981):

$$L = 100 / \%Gh$$

Considerando la longitud promedio (L) del péptido, se puede estimar su peso molecular promedio (PM). Teniendo en cuenta el PM de los aminoácidos ( $PM_{aa}$ ) basado en su abundancia relativa para cada proteína o mezcla de proteínas, siendo para el Amaranto, el valor aproximado de 130 ((Bressani 1994):

$$PM = L \times PM_{aa}$$

Los hidrolizados proteicos con valores de PM similares pueden tener distribuciones aminoacídicas sustancialmente diferentes, lo cual dependerá de la especificidad de la enzima utilizada en la reacción de hidrólisis.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente Capítulo es describir la caracterización de las muestras de Amaranto, que se emplearán en el resto del trabajo para modular la activación celular y el proceso inflamatorio.

### 2.2 Objetivos específicos

- Obtener hidrolizados a partir de muestras de harina de *Amaranthus hypochondriacus*.
- Separar en componentes mediante técnicas cromatográficas.
- Emplear herramientas bioinformáticas para evaluar las características secuenciales de los péptidos.
- Sintetizar péptidos candidatos para estudiar sus propiedades inmunomoduladoras.

## 3. Resultados

---

### 3.1 Caracterización de las muestras AI, AH23 y AH30

#### 3.1.1 Obtención del aislado proteico

El proceso de obtención del aislado proteico (AI) a partir de la harina de Amaranto depende fundamentalmente del pH de extracción debido a los cambios en la solubilidad de las proteínas presentes en la harina (Sección 1.1). Por lo tanto, la composición polipeptídica del producto y su rendimiento dependen de ello (Abugoch James 2006), (Abugoch, Martínez et al. 2010). Para obtener un AI de alto rendimiento en proteínas y rico en globulinas, la extracción se realizó a pH= 9,0 a partir de la harina de *Amaranthus hypochondriacus* (Sección 1.3).

La harina de Amaranto, analizada en nuestro grupo de trabajo (CIDCA), mostró un alto porcentaje de proteínas (~19%), mayor que el proveniente de los cereales (Innovation 1984, Barba de la Rosa, Fomsgaard et al. 2009), 10% de lípidos y 54% de hidratos de carbono.

#### 3.1.2 Obtención de hidrolizados proteicos a partir del aislado proteico

Se procedió a la obtención de AH a partir de AI, variando de disolvente y de pH, con el objetivo de alcanzar distintos grados de hidrólisis, necesarios para lograr una longitud peptídica promedio de 4 aminoácidos (Sección 1.2).

La muestra identificada como **AH23** (hidrolizado proteico de 23% grado de hidrólisis -23 %Gh) se obtuvo por incubación con alcalasa a pH= 7,8 y fuerza iónica 0,1 M, utilizando el buffer fosfato 35 mM (33,3 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 1,7 mmol/L  $KH_2PO_4$ ). Mientras que la muestra **AH30** (hidrolizado proteico de 30% grado de hidrólisis -30 %Gh) se obtuvo por incubación con la misma enzima a pH= 10 y mantenido el pH constante durante el transcurso de la reacción de hidrólisis con Na(OH) 0,5N (sección 1.4). El cálculo del %Gh se detalla en la sección 2.2.

Los resultados obtenidos indicaron que la muestra AH30 posee un incremento en el grado de hidrólisis del 7% con respecto a AH23, esto es debido a que el pH entre 8-10 es la condición óptima de estabilidad/actividad de la proteasa utilizada. El tiempo de incubación se fijó en 4 hs, debido a que la velocidad de hidrólisis enzimática disminuye con el tiempo de reacción, describiendo una curva cinética tipo Michaeliana (Vecchi 2007), en función de las concentraciones iniciales de enzima y sustrato.

En base al %Gh se calculó la longitud promedio (L) y peso molecular promedio (PM) de los péptidos obtenidos. Para AH23 se obtuvo un L=4,3 aa y un PM= 571,9 g/mol, en tanto que para AH30 resultó ser de un L=3,3 aa y un PM= 438,9 g/mol. Donde  $PM_{aa} = 133$ , es el peso molecular promedio de los aminoácidos de Amaranto.

Nuestro objetivo fue obtener péptidos de una L cercana al promedio de los 75 péptidos con actividad inmunomoduladora, descriptos hasta el 1/11/2012 en la base de datos BIOPEP (database of proteins and bioactive peptides) (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) (Minkiewicz, Dziuba et al. 2008) (Sección 3.2.2), la cual varía entre 3 - 6 aminoácidos, para el 71,7% del total de péptidos incluidos (Tabla 3).

**Tabla 3. Longitud promedio (L) de acuerdo a la base de datos BIOPEP a la fecha 2/11/2012**

Longitud peptídica (BIOPEP)	%
3	7,0
4	16,9
5	25,3
6	22,5
<b>Subtotal</b>	<b>71,7</b>

### 3.1.3 Determinación de humedad, cenizas y pH

Las muestras AI, AH23 y AH30, se caracterizaron mediante los parámetros de pH, contenido de agua y de cenizas. Las muestra AH23 presentaron un elevado porcentaje de cenizas, debido a las sales aportadas por el buffer fosfato 35 mM (33,3 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 1,7 mmol/L  $KH_2PO_4$ ) (Sección 1.4), utilizado para suspender el AI antes de realizar la hidrólisis.

**Tabla 4. Contenido de humedad, cenizas y pH de las muestras AI, AH23 y AH30**

Características	AI	AH23	AH30
Humedad (%p/p) <sup>1</sup>	7,13 ± 0,17 <sup>a</sup>	9,49 ± 0,02 <sup>b</sup>	8,06 ± 0,09 <sup>c</sup>
Cenizas (%p/p) <sup>2</sup>	3,33 ± 0,18 <sup>a</sup>	27,04 ± 0,18 <sup>b</sup>	6,03 ± 0,13 <sup>c</sup>
pH	7,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,0 ± 0,1 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Porcentaje expresado como g H<sub>2</sub>O/100g totales

<sup>2</sup> Porcentaje expresado en muestra base húmeda

Las valores contenidos en una misma fila con letras superíndice distintas, poseen diferencias estadísticamente significativas (p <0,05). Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's. Los resultados se expresan como la Media ± SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

Los valores obtenidos (Tabla 4) son concordantes con resultados previos de nuestro laboratorio (Martínez and Añón 1996, Avanza and Añón 2007).

### 3.1.4 Determinación del % de proteínas, solubilidad proteica y grado de hidrólisis

Los valores de solubilidad proteica en el buffer DMEM adhesión (pH= 7,4) de AH23 y AH30 son similares, pero notablemente mayores que el correspondiente a AI (Tabla 5). Esto es debido a la hidrólisis enzimática que genera una disminución del PM de las especies peptídicas con un aumento de los grupos carboxilo y amino terminales ionizados, incrementando la hidrofiliidad de los polipéptidos obtenidos (Mahmoud 1994) (Scilingo, Molina Ortiz et al. 2002).

Además se observó que el contenido proteico de la muestra AH23 es relativamente bajo (51,02 %p/p), debido a la alta concentración de sales del buffer fosfato 35 mM (33,3 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (sección 1.4) utilizado para suspender el AI antes de llevar a cabo su hidrólisis.

**Tabla 5. Solubilidad, contenido proteico y %Gh de AI, AH23 y AH30**

	AI	AH23	AH30
Grado de Hidrólisis (%Gh) <sup>1</sup>	-	22,81 ± 0,38 <sup>a</sup>	30,30 ± 1,11 <sup>b</sup>
Solubilidad proteica en DMEM (%p/p) <sup>2</sup>	63,20 ± 1,40 <sup>a</sup>	91,85 ± 0,58 <sup>b</sup>	87,60 ± 5,26 <sup>b</sup>
Contenido proteico (%p/p) <sup>3</sup>	75,40 ± 1,73 <sup>a</sup>	51,02 ± 0,47 <sup>b</sup>	68,4 ± 0,15 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Método TNBS (sección 2.2)

<sup>2</sup> Método MicroKjeldhal (sección 2.4.2). Porcentaje expresado con respecto a proteína total (determinada por Kjeldhal).

<sup>3</sup> Método Kjeldhal (sección 2.4.1). Porcentaje expresado de muestra en base húmeda.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado. Los valores pertenecientes a una misma fila con superíndice distintos, poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Test Anova de una vía, seguido de prueba Tukey's.

### 3.1.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En la Figura 7 se presentan los termogramas correspondientes a las muestras AI, AH23 y AH30 disueltas en el medio buffer DMEM Adhesión.

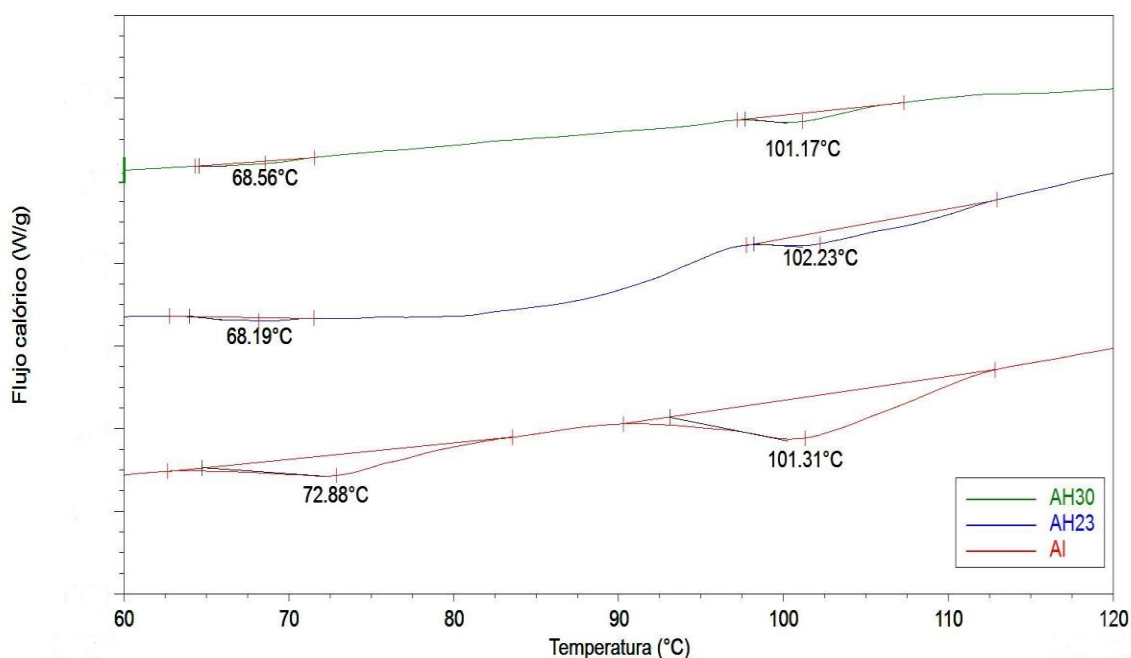


Figura 7. Termogramas de DSC correspondientes a una corrida para AI, AH23 y AH30. La velocidad de calentamiento es de 10 °C/min.

Se observó en **AI** dos transiciones endotérmicas, correspondientes a la temperatura de desnaturalización ( $T_d$ ) de las diferentes especies proteicas:  $72,84 \pm 0,06$  °C y  $101,33 \pm 0,03$  °C. La primera corresponde a la desnaturalización de la fracción albúminas (Albumina=  $T_d$ : 64°C) y la segunda a la de las globulinas (globulina-11S=  $T_d$ : 95°C, globulina-P=  $T_d$ : 94°C, globulina-7S=  $T_d$ : 80,2°C) (Martínez and Añón 1996). No deberíamos encontrar prolaminas ni gliadinas debido a su insolubilidad en el solvente de extracción ( $H_2O$  a pH=9), utilizado para la obtención del AI.

En el termograma correspondiente a **AH23**, las temperaturas de los picos de desnaturalización detectados fueron a  $68,33 \pm 0,20$  °C y  $101,69 \pm 0,76$  °C, mientras que para **AH30** fueron a  $68,22 \pm 0,35$  °C y  $99,93 \pm 4,03$  °C. En ambos hidrolizados se detectó un corrimiento hacia valores inferiores de  $T_d$  con respecto a AI, indicando que las proteínas parcialmente hidrolizadas y/o los polipéptidos productos de la hidrólisis, poseen una menor estabilidad térmica, determinada por su composición aminoacídica. Esto determina que se requiera una menor temperatura para provocar la desnaturalización (Tabla 6).

Además, AH23 y AH30, mostraron valores de entalpía de desnaturalización ( $\Delta H_d$ = J/g de proteína en base seca) menores al correspondiente a AI, calculada como el área bajo la curva de cada pico. Esto indica que la hidrólisis enzimática provocó la pérdida parcial o total de la estructura de las proteínas, estabilizada por las interacciones inter e intra-moleculares (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y uniones electrostáticas). AH23 y AH30 conservaron aproximadamente un 12% de la estructura molecular inicial de las albúminas y un 30% de las globulinas (Tabla 6).

**Tabla 6. Temperaturas y entalpías de desnaturalización de las muestras AI, AH23 y AH30**

Muestra	$T_d$ (°C)	$\Delta H_d$ (J/g prot)	Desnaturalización (%)
AI	$72,84 \pm 0,06$ <sup>a</sup>	$1,66 \pm 0,25$ <sup>a</sup>	0
	$101,33 \pm 0,03$ <sup>c</sup>	$4,00 \pm 0,76$ <sup>c</sup>	0
AH23	$68,33 \pm 0,20$ <sup>b</sup>	$0,19 \pm 0,03$ <sup>b</sup>	88,5
	$101,69 \pm 0,76$ <sup>c</sup>	$1,38 \pm 0,05$ <sup>d</sup>	65,5
AH30	$68,22 \pm 0,35$ <sup>b</sup>	$0,21 \pm 0,05$ <sup>b</sup>	87,3
	$99,93 \pm 4,03$ <sup>c</sup>	$1,23 \pm 0,02$ <sup>d</sup>	69,25

Las valores  $T_d$  y  $\Delta H_d$  con superíndice distintos, poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

### 3.1.6 Determinación de la composición polipeptídica por electroforesis Tricina SDS-PAGE

La composición polipeptídica de las muestras AI, AH23 y AH30 se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante en geles de Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras (2-ME) y no reductoras, con el fin de evidenciar los polipéptidos de masa molecular menor a 100 kDa.



### 3.1.6.1 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30 en condiciones reductoras

En la Figura 8 se muestran los perfiles electroforéticos en Tricina SDS-PAGE en presencia de 2-ME de las muestras AI, AH23 y AH30, disueltas en buffer muestra.

En el perfil electroforético de AI se observó una prevalencia de los polipéptidos que forman parte de la fracción de las globulinas, en particular globulina-11S, constituida por los polipéptidos ácidos (banda a  $33 \pm 2$  kDa) y polipéptidos básicos (3 bandas  $19-23 \pm 1$  kDa). También se detectaron, aunque con menor intensidad, bandas en la región de  $55 \pm 1$  kDa correspondientes a polipéptidos de la globulina-P y globulina-7S; y especies proteicas de  $40 \pm 2$  kDa que se encuentran formando parte de la fracción globulina-7S. Las especies polipeptídicas de mayor peso molecular, bandas de **98-64 kDa**, corresponden a diferentes subunidades de las globulina-7S y globulina-11S, no disociadas. La región de bandas inferiores a **17 kDa** pertenecen a la fracciones de las albuminas.

En los perfiles electroforéticos de AH23 y AH30 se observó una disminución importante en la tinción de las bandas, indicando una acentuada hidrólisis de las proteínas y de los polipéptidos presentes en AI, que condujeron a la obtención de secuencias peptídicas de pequeño tamaño no retenidas por la matriz del gel.

En el perfil electroforético de AH23 se encontraron dos bandas tenues a  $55 \pm 1$  kDa, correspondiente a polipéptidos de globulina-7S y de globulina-P. Además se observaron 3 bandas en la región de  $19-23 \pm 1$  kDa, correspondientes a diferentes polipéptidos básicos de globulina-11S, los cuales son los más resistentes a la hidrólisis enzimática. Por último se detectaron bandas a  $37 \pm 1$  kDa y en la región inferior a **17 kDa**, que corresponderían a péptidos provenientes de la degradación enzimática.

En el perfil electroforético de AH30, en la región de  $19-23 \pm 1$  kDa se observó la disminución en la intensidad de las dos bandas superiores y la desaparición de la tercera inferior, que corresponden a los polipéptidos básicos de globulina-11S. Se detectó, además, con baja intensidad la banda de  $37 \pm 2$  kDa correspondiente a péptidos productos de la hidrólisis. Por último se observó la disminución en la intensidad de las bandas menores a **17 kDa**, que son productos provenientes de la degradación enzimática, lo cual indica que los péptidos de menor tamaño siguen siendo sustrato de la enzima

alcalasa, originando productos de menor tamaño que no pudieron ser retenidos en la matriz del gel.

Estos resultados son coincidentes con otros obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Martínez and Añón 1996, Quiroga 2008).

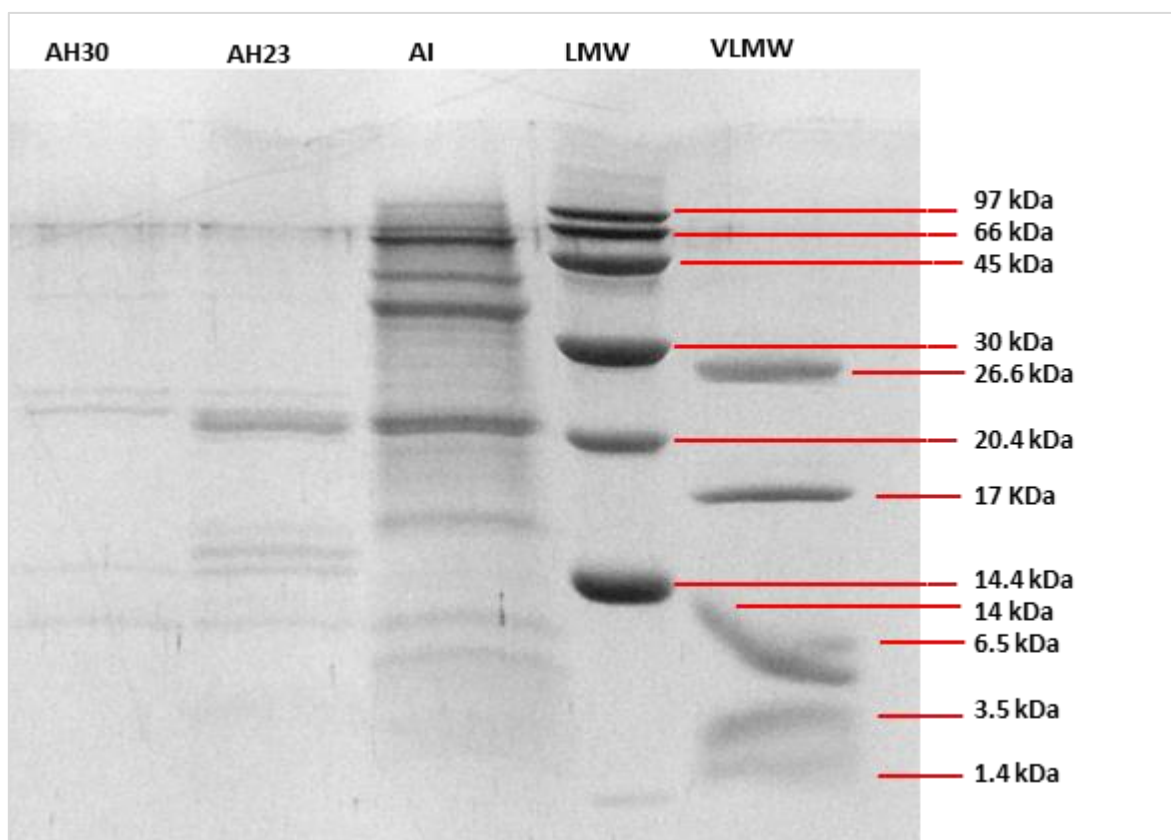


Figura 8. Electroforesis Tricina SDS-PAGE con 2-ME de las muestras AI, AH23 y AH30.

### 3.1.6.1.1 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30, en condiciones reductoras y en distintos solventes

Se realizó una electroforesis Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras (2-ME) de las muestras AI, AH23 y AH30 para determinar si existen diferencias en la composición polipeptídica de las mezclas proteicas cuando son solubilizadas en distintos solventes ( $H_2O$  y DMEM Adhesión). Para ello se suspendieron las muestras en los respectivos solventes, se agitaron durante 60 min a 650 rpm a 25°C en un agitador Thermomixer y luego se centrifugaron a 9200 xg durante 10 min a 25 ° C en una microcentrífuga Labnet.

Los sobrenadantes se diluyeron en buffer muestra y se sembraron 20-30 µg de proteína/calle (Sección 2.6).

En la Figura 9 se puede observar una distribución de bandas similar a la obtenida en la Sección anterior (3.1.6.1), con aumento en la intensidad por mayor concentración de las muestras sembradas en las calles. Se detectaron correlaciones de las bandas para cada una de las muestras ensayadas en ambos medios de disolución (H<sub>2</sub>O y DMEM Adhesión). Esto nos indica que la composición polipeptídica de las fracciones solubles en H<sub>2</sub>O y DMEM Adhesión es equivalente.

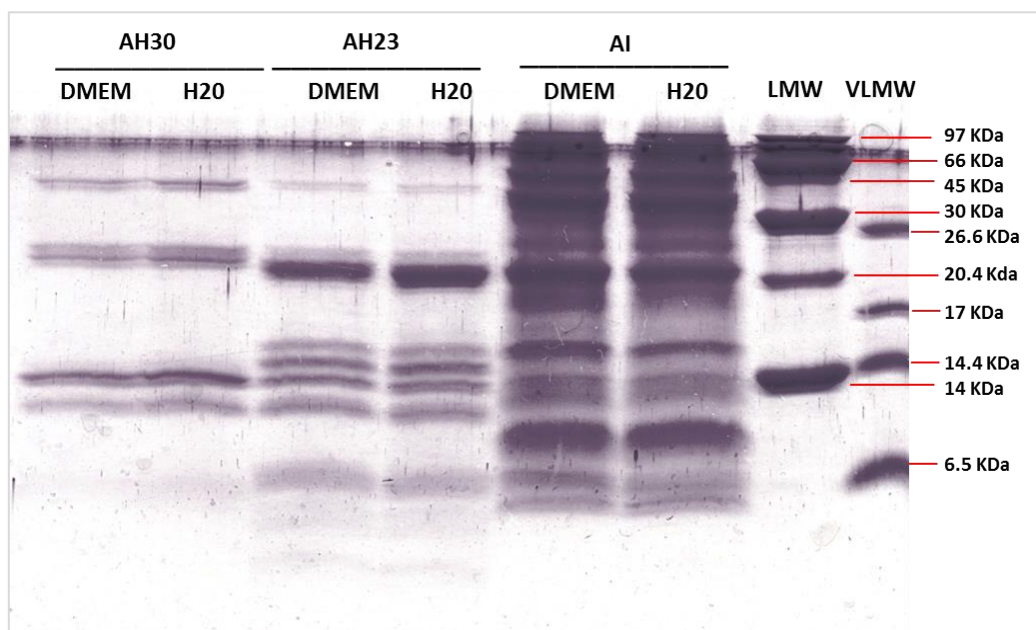


Figura 9. . Electroforesis Tricina SDS-PAGE con 2-ME de las muestras AI, AH23 y AH30 disueltas en H<sub>2</sub>O y DMEM Adhesión.

### 3.1.6.2 Perfil electroforético de AI, AH23 y AH30, en condiciones no reductoras

En la Figura 10 se muestran los perfiles electroforéticos en Tricina SDS-PAGE en ausencia de 2-ME, correspondientes a las muestras AI, AH23 y AH30, disueltas en buffer muestra (Sección 2.6).

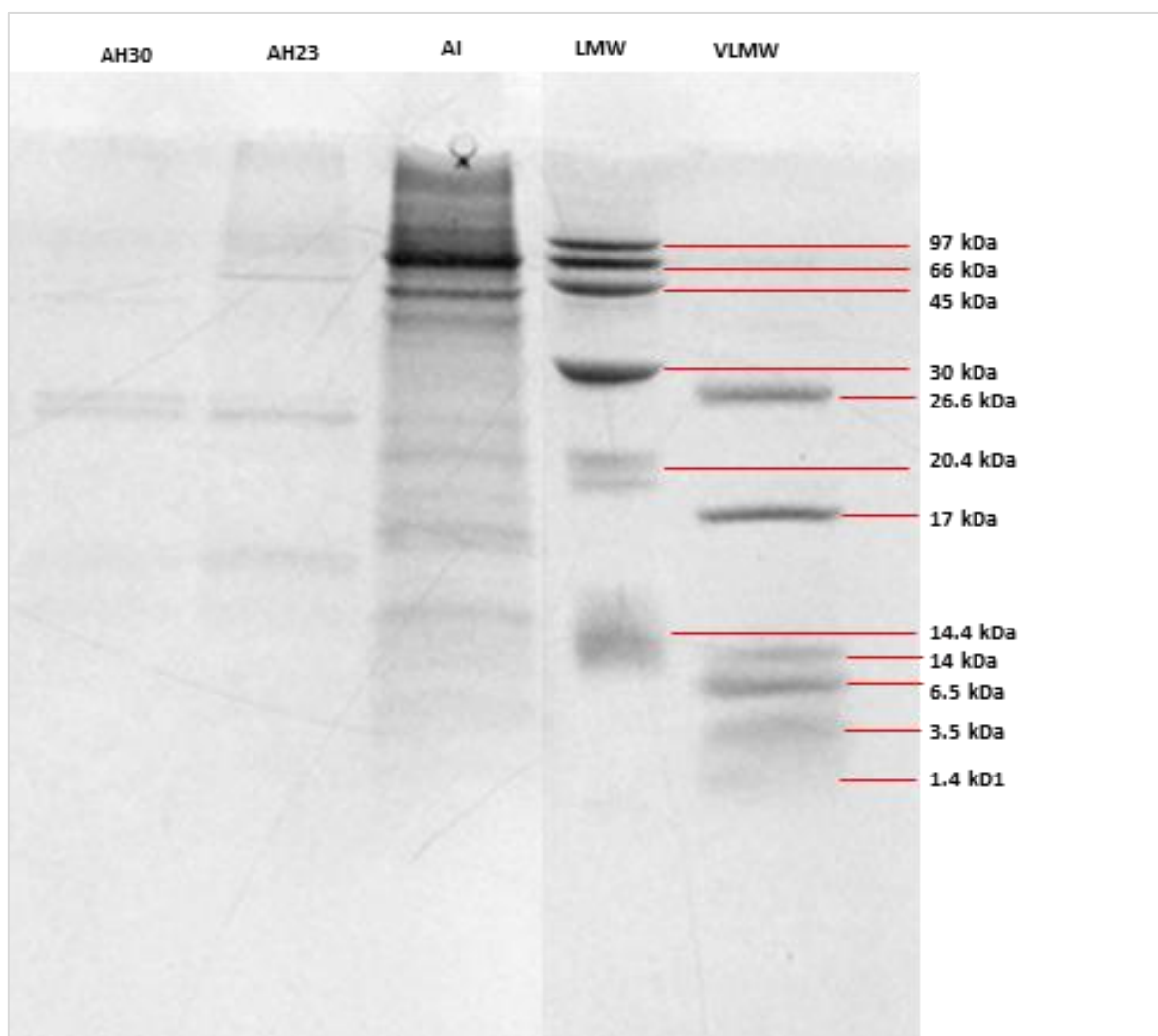


Figura 10. Electroforesis Tricina SDS-PAGE de las muestras AI, AH23 y AH30.

En el perfil electroforético de **AI** (Figura 10), se observaron bandas por encima de **66 kDa** que corresponden a péptidos y/o proteínas de globulina-11S y globulina-7S que conforman agregados proteicos de alto PM, agregados solubles o subunidades que se encuentran parcialmente desnaturalizadas. A **66 kDa**, se observó una distribución de bandas similar a la obtenida en condiciones reductoras (Figura 8), pero con disminución en la intensidad de las mismas.

En los perfiles de **AH23 y AH30** se observaron escasas diferencias con respecto a los perfiles obtenidos en condiciones reductoras (Figura 8). Es posible observar una marcada disminución en la intensidad de las bandas de la región de **19-23 ± 1 kDa**, correspondiente al polipéptido básico de globulina-11S.

Como conclusión general de la Sección 3.1.6, los perfiles electroforéticos de AH23 y AH30 con respecto a AI, mostraron la pérdida total de bandas y una disminución importante en la tinción de las restantes, causada por la hidrólisis enzimática. Se detectó un pequeño aumento en la intensidad de las bandas en los intervalos de  $37 \pm 2$  kDa y de 6,5-17 kDa, provenientes de productos de degradación de las especies proteicas originales. Se percibió refractariedad a la hidrólisis en el triplete de  $19-23 \pm 1$  kDa, correspondiente al polipéptido básico de globulina-11S. Además, no se detectaron cambios en los perfiles por la incubación en los solventes H<sub>2</sub>O y DMEM Adhesión.

## 3.2 Caracterización de las muestras obtenidas por RP-HPLC

### 3.2.1 Obtención de los Segmentos hidrofílicos, intermedio e hidrofóbico

Las muestras AH23 y AH30 se analizaron mediante cromatografía RP-HPLC (Sección 2.5.3) con el objetivo de separarlas en sus componentes y poder identificar el número aproximado de especies peptídicas presentes, mediante detección a  $\lambda=210$  nm y  $\lambda=280$  nm.

En la Figura 11 se observa el espectro de elución de AH23 y AH30, el cual se dividió en forma arbitraria en 3 intervalos de tiempo de elución: el **Segmento hidrofílico** (Seg1), seguido por el **Segmento intermedio** (Seg2) y por último el **Segmento hidrofóbico** (Seg3). Se realizó la deconvolución de cada Segmento y se determinó la cantidad de picos de elución y las áreas correspondientes, mediante el programa PeakFit v4.12.

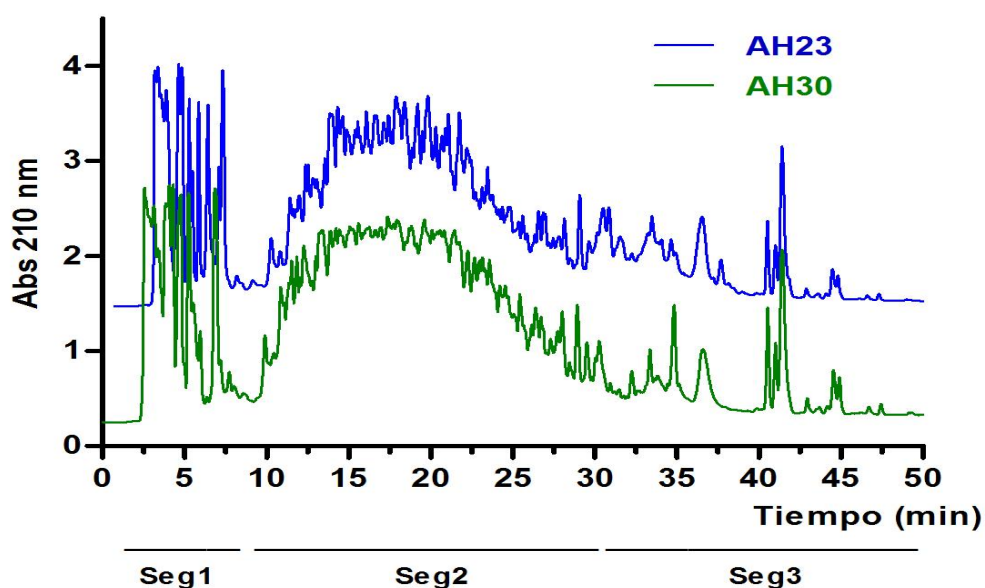


Figura 11. Cromatografía RP-HPLC de AI, AH23 y AH30, a  $\lambda=210$  nm.

Haciendo uso del cromatograma obtenido a  $\lambda=210$  nm, correspondiente a la absorción del enlace peptídico (Figura 11), se determinó en **AH23** un total de 179 picos, distribuidos de la siguiente manera (Tabla 7): el Seg2 con 111 picos y con el mayor porcentaje de área, sugiriendo la mayor concentración de muestra, seguido por el Seg3 con 42 picos y por último el Seg1 con 26 picos. Para **AH30**, se detectaron 198 picos, los cuales se reparten de la siguiente manera: el Seg2 con 128 picos, seguido el Seg1 con 37 picos y el Seg3 con 33 picos.

Tabla 7. Número de picos y área integrada a  $\lambda=210$  nm, correspondientes a los Seg1, Seg2 y Seg3.

Muestra	Tiempo elución (min)	Intervalo tiempo (min)	N° Picos (AH23)	Área Integrada (AH23)	N° Picos (AH30)	Área Integrada (AH30)
Seg1	2 – 8,59	7	26	4,87	37	6,61
Seg2	9 – 30,59	22	111	19,14	128	24,59
Seg3	31 – 49,59	19	42	3,60	33	2,93
Total		48	179		198	

Luego se realizó el mismo procedimiento con el cromatograma obtenido a  $\lambda=280$  nm, correspondiente a la absorción de los residuos aromáticos de los aminoácidos tirosina (Y), triptofano (W) y fenilalanina (F) (Figura 12).

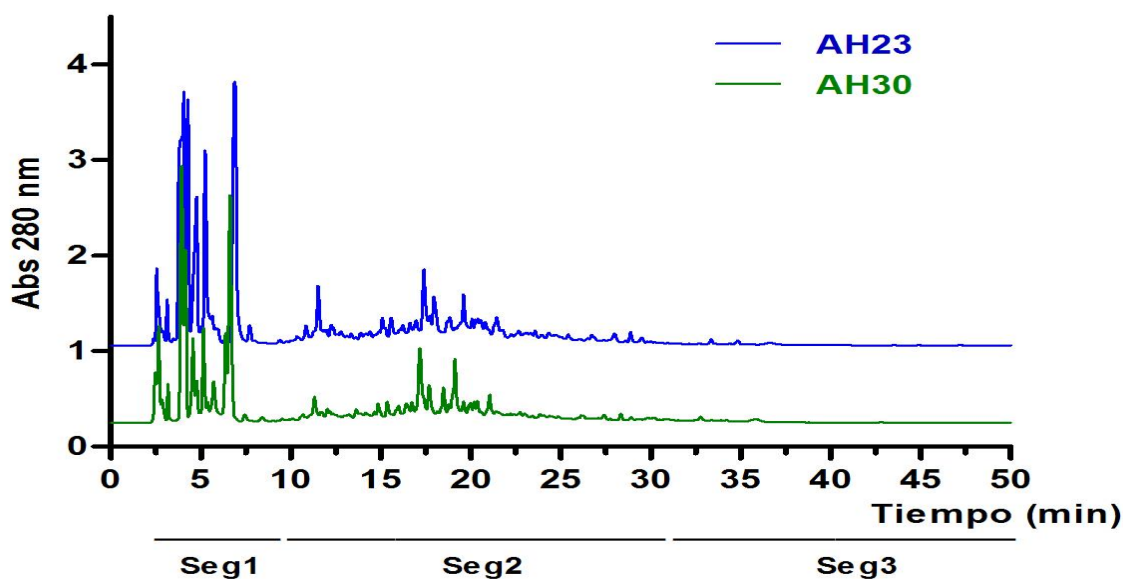


Figura 12. Cromatografía RP-HPLC de AI, AH23 y AH30, a  $\lambda=280$  nm

En la muestra **AH23** se detectaron un total de 199 picos (Tabla 8): el Seg2 presentó 99 picos y el mayor porcentaje de área bajo la curva, seguido por el Seg3 con 77 picos y por último el Seg1 con 23 picos. Para **AH30**, se detectó un total de 142 picos: el Seg2 es el preponderante con 89 picos, seguido por el Seg3 con 28 picos y por último el Seg1 con 25 picos.

Tabla 8. Número de picos y área integrada a  $\lambda=280$  nm, correspondientes a los Seg1, Seg2 y Seg3.

Muestra	Tiempo elución (min)	Intervalo tiempo (min)	N° Picos (AH23)	Área integrada (AH23)	N° Picos (AH30)	Área integrada (AH30)
Seg1	2 – 8,59	7	23	2,92	25	2,04
Seg2	9 – 30,59	22	99	2,25	89	1,57

<b>Seg3</b>	<b>31 – 49,59</b>	<b>19</b>	<b>77</b>	<b>0,10</b>	<b>28</b>	<b>0,115</b>
<b>Total</b>		<b>48</b>	<b>199</b>		<b>142</b>	

Podemos concluir que en las condiciones cromatográficas en las que se analizaron las muestras, se detectaron 199 y 198 picos para AH23 y AH30, respectivamente. Esto revela la gran variedad de péptidos que se generaron mediante la aplicación de los procedimientos hidrolíticos.

### 3.2.2 Obtención de muestras M1-M80 a partir de AH30

Posteriormente a **AH30** se la separó nuevamente en sus componentes, mediante RP-HPLC (Sección 2.5.4). En esta oportunidad se recolectaron muestras cada 0,6 min de elución, obteniéndose 80 fracciones proteicas, denominadas consecutivamente de **M1-M80** (Tabla 9).

**Tabla 9. Muestras M1-M80 obtenidas por elución de AH30**

<b>Muestras</b>	<b>Segmentos</b>	<b>Tiempo de elución (min)</b>
<b>M1 - M12</b>	<b>Seg1</b>	<b>2 - 9</b>
<b>M13 - M49</b>	<b>Seg2</b>	<b>9 - 31</b>
<b>M50 - M80</b>	<b>Seg3</b>	<b>31 - 50</b>

Del total de 80 muestras, nos interesaron 11 de ellas: M1, M2, M4, M10, M19, M23, M24, M26, M32, M46, M49, debido a que presentaron propiedades inmunomoduladoras (Capítulo II). Estas se analizaron mediante electroforesis Tricina SDS-PAGE en condiciones reductoras (Figura 13 y Figura 14), como se describió anteriormente (Sección 2.6).

En las muestras **M10, M19, M23, M24, M26, M32, M46 y M49** se detectaron especies con masas moleculares inferiores a 17 kDa que corresponden a péptidos provenientes de la hidrólisis enzimática. En las muestras **M32, M46 y M49** se detectó una banda en la región de **19-23 ±1 kDa**, correspondiente a polipéptidos básicos de la globulina-11S. Además en **M49** se observó una banda a **37 ± 2 kDa**, correspondiente a péptidos provenientes de la degradación enzimática.



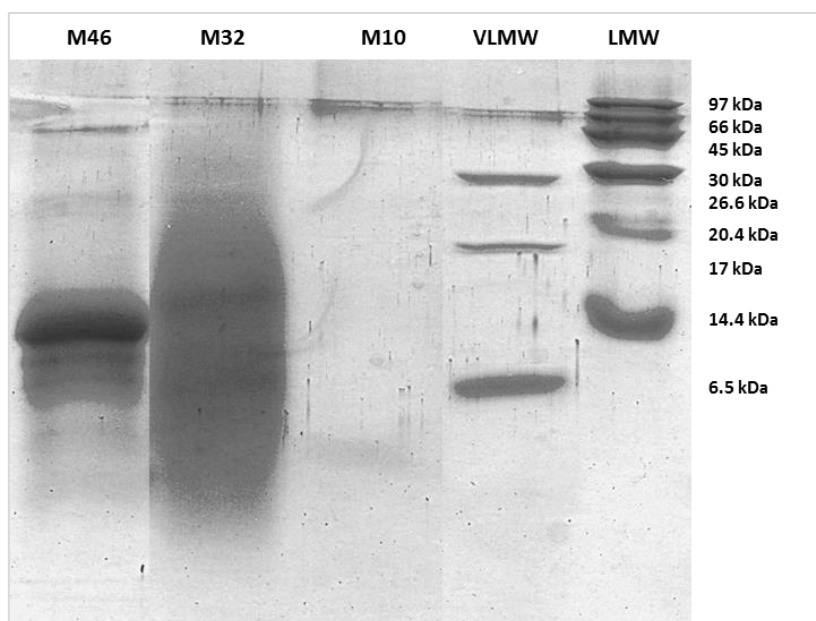


Figura 13. Electroforesis Tricina SDS-PAGE con 2-ME de las muestras M10, M32 y M46.

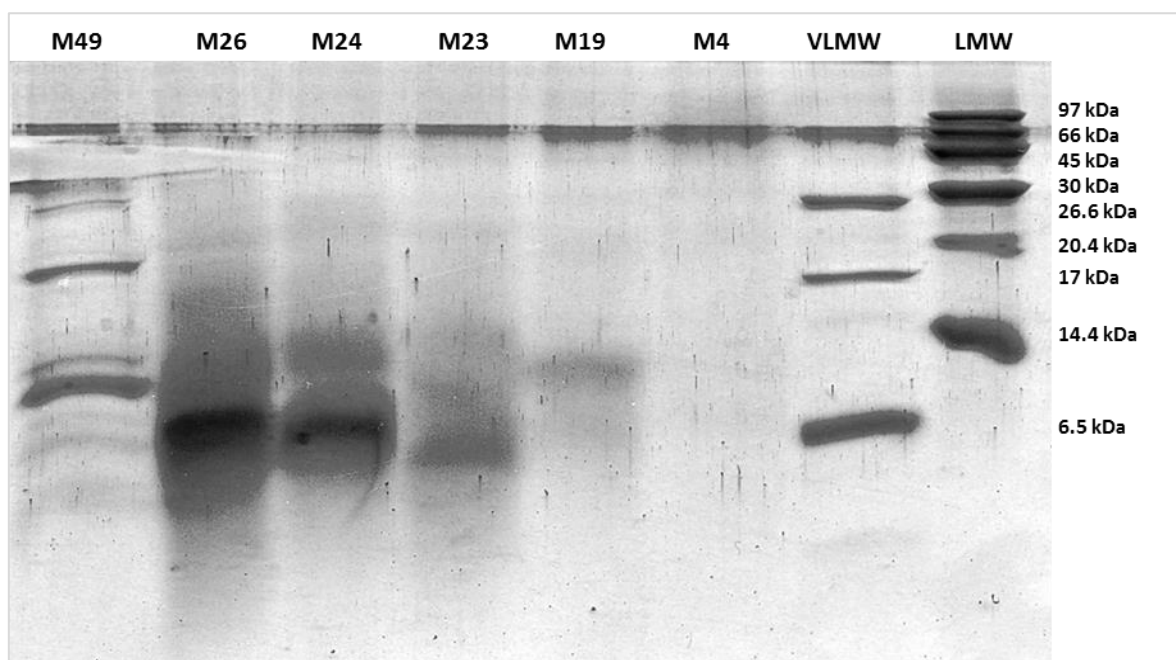
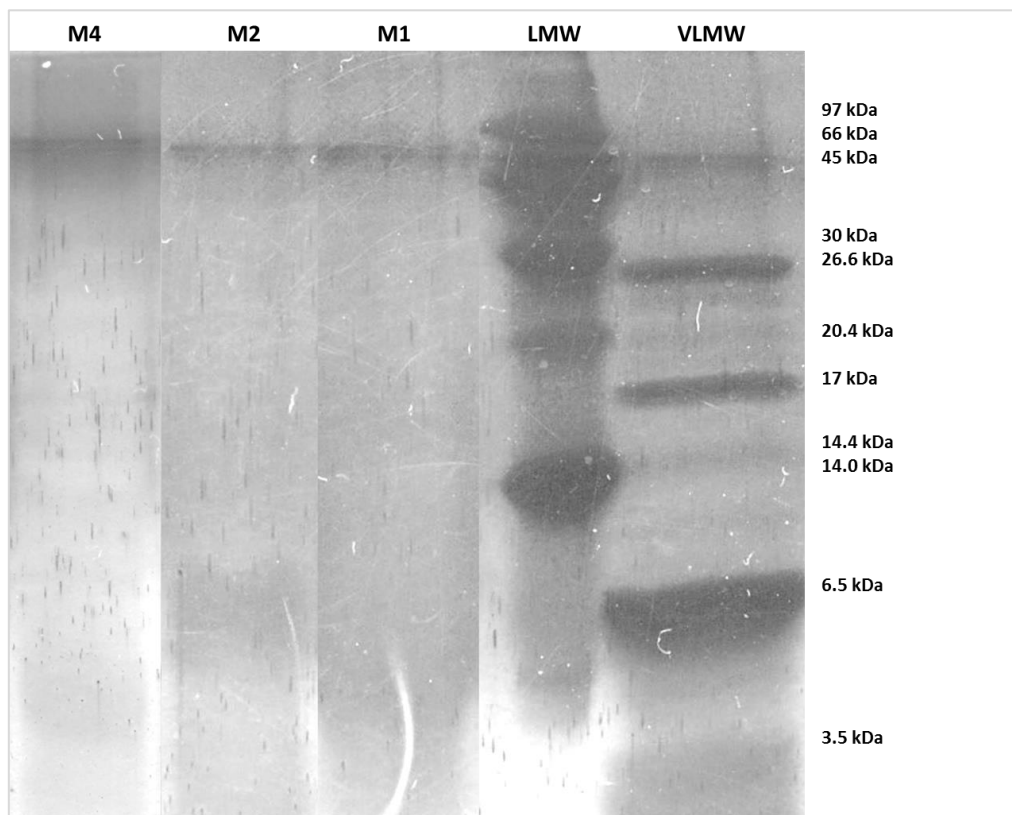


Figura 14. Electroforesis Tricina SDS-PAGE con 2-ME de las muestras M4, M19, M23, M24, M26 y M49

A **M1**, **M2** y **M4** (Figura 15) se les realizó una nueva electroforesis con mayor concentración de muestra por calle, y los geles se tiñeron con Ag (para aumentar la sensibilidad), debido que no fue posible detectar bandas haciendo uso del colorante

Coomassie Brilliant Blue. En los perfiles de las muestras se observaron bandas muy tenues en la región de **3,5-7kDa** pertenecientes a péptidos provenientes de la hidrólisis enzimática.



**Figura 15. Electroforesis Tricina SDS-PAGE con 2-ME con tinción de Ag de las muestras M1, M2 y M4**

En conclusión, en todas las fracciones analizadas por electroforesis se detectaron bandas pertenecientes a especies peptídicas provenientes de degradación enzimática. En particular, M1, M2 y M4 presentaron bandas de muy bajo PM.

### 3.2.3 Obtención de las muestras F1-F15 a partir de M1 y M2

En base a la elevada capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria por parte de las fracciones M1 y M2, se seleccionaron del total de 80 fracciones (véase Capítulo II) para su separación en componentes mediante RP-HPLC, siguiendo la técnica descrita en la Sección 2.5.5 (Figura 16).

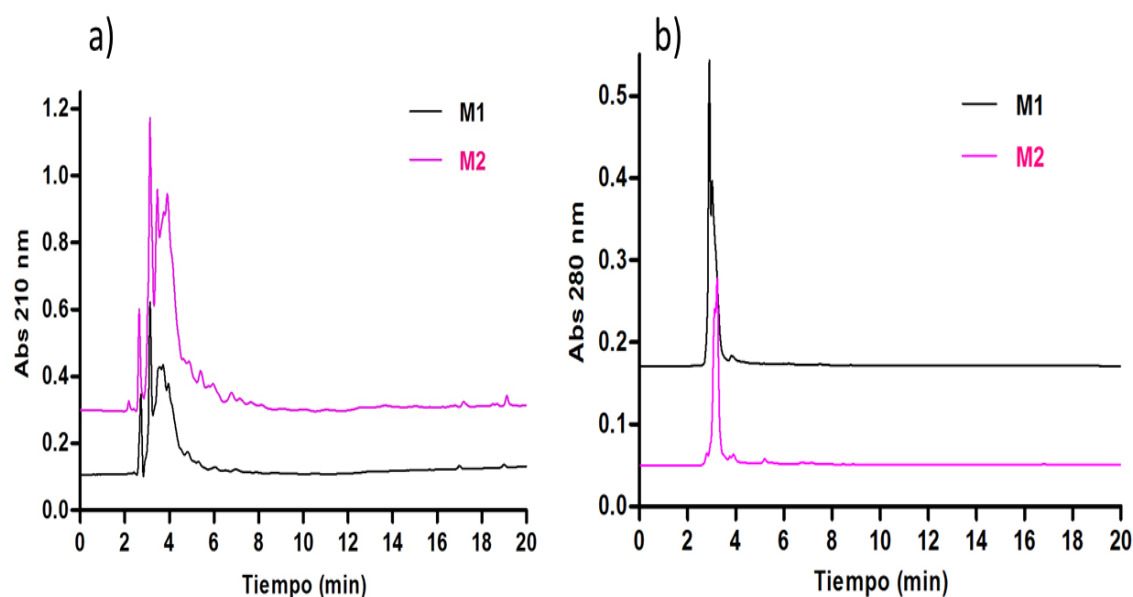


Figura 16. Cromatografía RP-HPLC de M1 y M2: a)  $\lambda = 210\text{nm}$  y b)  $\lambda = 280\text{nm}$

Para el cálculo de la cantidad de picos de elución de las especies presentes en cada muestra, se realizó la deconvolución del espectro utilizando el programa PeakFit. Para M1 y M2, a  $\lambda = 210\text{ nm}$ , se obtuvieron 22 y 30 picos respectivamente. Mientras que a  $\lambda = 280\text{ nm}$ , se detectaron 8 y 20 picos, respectivamente (Tabla 10).

Tabla 10. Muestra M1 y M2. Determinación del número de picos

Muestra	Tiempo elución (min)	Intervalo tiempo (min)	N° Picos ( $\lambda = 210\text{ nm}$ )	N° Picos ( $\lambda = 280\text{ nm}$ )
M1	2 – 20	18	22	8
M2	2 - 20	18	30	20

Teniendo en cuenta el tiempo de retención de cada uno de los picos en el espectro de absorción a  $\lambda = 210\text{ nm}$ , se decidió recolectar 15 fracciones en forma manual (F1 - F15) para M1 y M2 (Tabla 11).

Tabla 11. Fracciones F1 - F15 a distintos tiempos de elución.

Muestras	Tiempo elución (min)	Muestras	Tiempos elución (min)
F1	2,4 - 2,9	F9	7,0 - 7,5
F2	2,9 - 3,4	F10	7,5 - 8,2
F3	3,4 - 3,8	F11	16,5 - 17,0
F4	3,8 - 4,5	F12	17,0 - 17,6
F5	4,5 - 5,1	F13	17,6 - 18,3
F6	5,1 - 5,6	F14	18,3 - 18,8
F7	5,6 - 6,4	F15	18,8 - 19,5
F8	6,4 - 7,0		

El objetivo final de esta Sección 3.2 fue la obtención de muestras simples a partir de muestras complejas, mediante la separación en sus componentes por empleo del equipo RP-HPLC. El procedimiento se inició con AH, que presentó aproximadamente 200 picos de elución y tiempos de retención superiores a 50 min a un flujo de elución elevado (5,2 mL/min), hasta la obtención de fracciones (F1-F15) con menos de 4 picos cada una y un tiempo de retención alrededor de 0,7 min a flujo mínimo (1,1 mL/min).

### 3.3 Secuenciación, análisis bioinformáticos y síntesis de péptidos

#### 3.3.1 Secuenciación peptídica de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 de M2

En base a la elevada capacidad moduladora de la respuesta proinflamatoria por parte de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 provenientes de la muestra M2 (véase Capítulo II), se realizaron nuevas separaciones en componentes por RP-HPLC de M2, recolectándose en forma manual las fracciones antes mencionadas según el espectro obtenido a 210 nm (Figura 17).

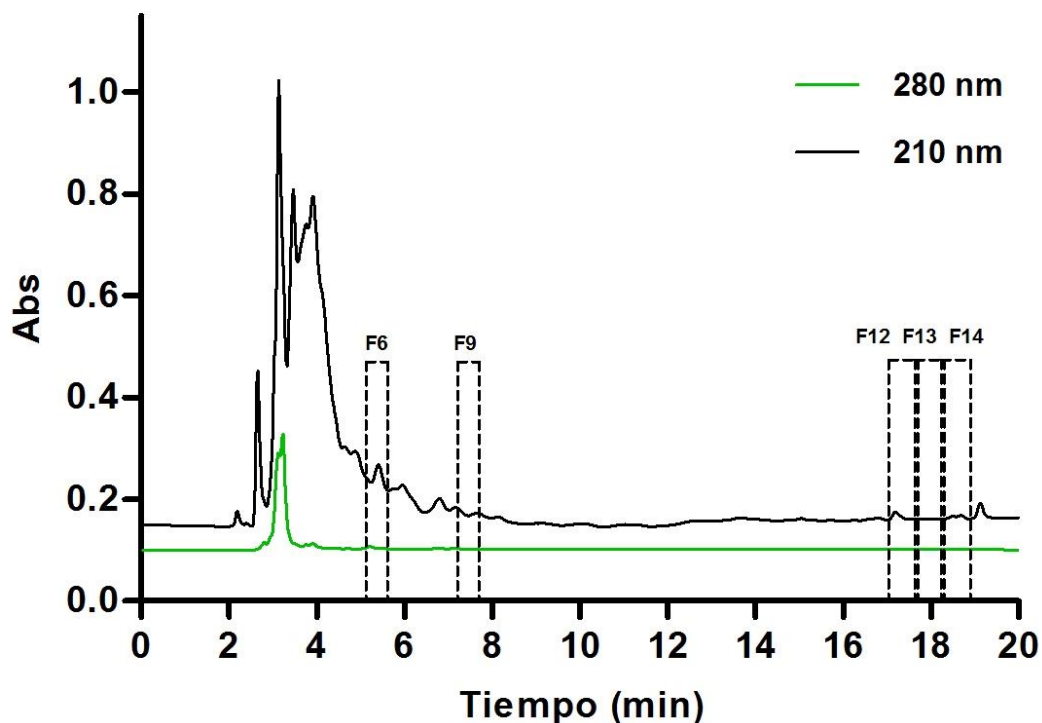


Figura 17. Cromatograma a  $\lambda = 210$  y 280 nm de la muestra M2, con marcación de los tiempos de retención de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14.

Se determinó la cantidad de picos de elución de F6, F9, F12, F13 y F14, en base a los espectros obtenidos a 210 nm (Figura 18) y 280 nm (Figura 19) a través del programa Peak Fit (Tabla 12).

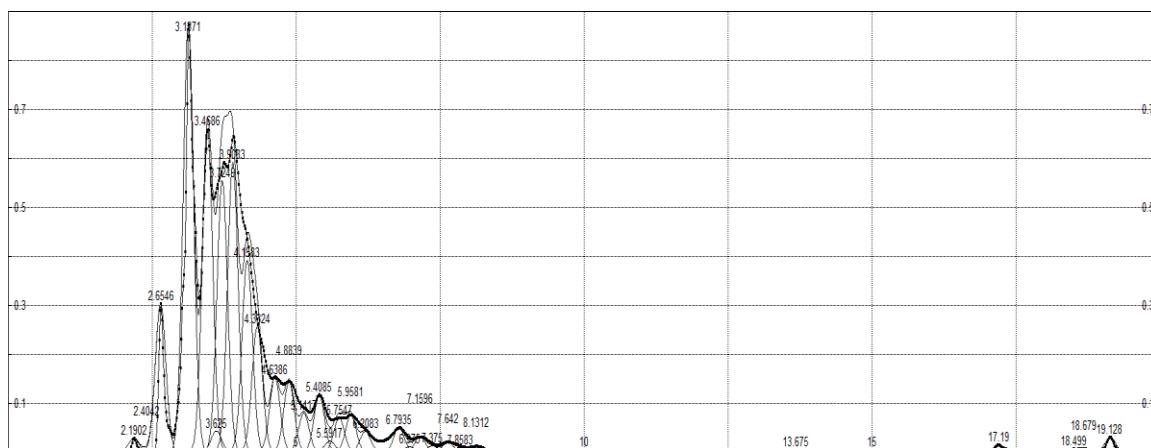


Figura 18. Cromatograma de M2 a  $\lambda = 210$  nm, con marcación de los picos que conforman el espectro.

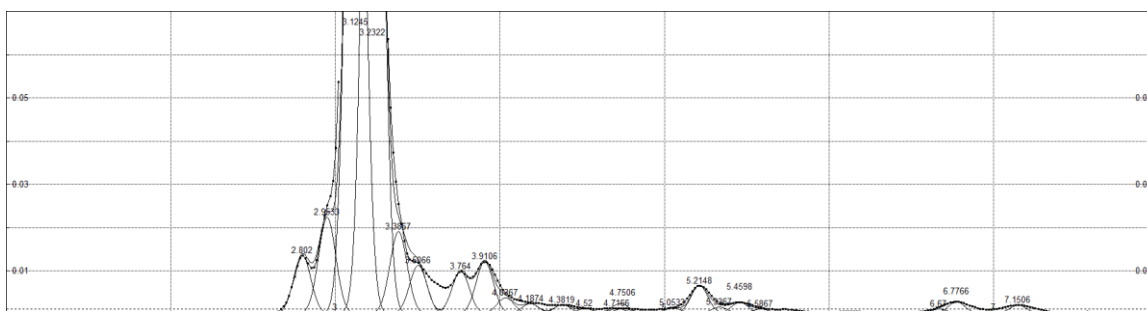


Figura 19. Cromatograma de M2 a  $\lambda=280$  nm. con la marcación de los picos que conforman el espectro.

Luego las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 se analizaron por Nano cromatografía/ Espectrometría de masa (UHPLC/ ESI-MS) (Sección 3.1), identificándose los siguientes 16 péptidos (Tabla 12): AVRNDDE, LENAIDK, LENAIDKK, SSEDIKE, SIDEDAGE, KEISDDEDEE, MADVQMAEAE, EALNDEE, EGGDEIKE, DDGADEIK, ISDDEDEPK, ISDDEDEPKKE, QDDGADEIK, GKVEDVDEE, IADEDPDEANDK, IADEDPDEANDKDK.

Tabla 12. Péptidos secuenciados a partir de las muestras F6, F9, F12, F13 y F14, provenientes de M2

Muestras	Tiempos (min)	Picos (min) $\lambda=210$ nm	Picos (min) $\lambda=280$ nm	Péptidos
F6	5,1-5,6	5,14 5,40 5,59	5,21 5,34 5,46 5,59	AVRNDDE
F9	7,0-7,5	7,16 7,37	7,15	LENAIDK LENAIDKK
F12	17,0-17,6	17,18		SSEDIKE SIDEDAGE KEISDDEDEE MADVQMAEAE
F13	17,6-18,3			EALNDEE EGGDEIKE DDGADEIK ISDDEDEPK ISDDEDEPKKE
F14	18,3-18,8	18,50		QDDGADEIK

		18,68		GKVEDVDEE IADEDPDEANDK IADEDPDEANDKDK
--	--	-------	--	---

En resumen, se identificaron 16 péptidos provenientes de las 5 fracciones de M2. El objetivo siguiente será realizarles análisis bioinformáticos para determinar cuáles serán elegidas para su síntesis.

### 3.3.2 Determinación de secuencias homólogas en proteínas del subreino plantas verdes

Se procedió a realizar la identificación de las proteínas presentes en el subreino de plantas verdes (*Viridiplantae*), que posean en su estructura primaria secuencias peptídicas homólogas a los péptidos detectados en las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 (Tabla 13). Para ello se utilizó la base de datos NCBI al 15 mayo del 2015, restringida al subreino *Viridiplantae* y utilizando el programa BLAST (blastp) (Sección 3.2.1).

**Tabla 13. Secuencias peptídicas halladas en proteínas presentes en subreino de plantas verdes (*Viridiplantae*).**

Péptidos	Especie/ Características	Secuencia (ID)	Score	Identidad (%)	E-valor
AVRNDDE (L.AVRNDDE.L)	Histone H2A-like protein, partial [ <i>Picea sitchensis</i> ] (forma parte del nucleosoma, Coníferas, Pino)	<u>gb ADM74431.1 </u> 	31,6	100	0,28
LENAIDK (L.LENAIDK.K)	Maturase K [ <i>Amaranthus praetermissus</i> ] (enzima implicada en la fotosíntesis en cloroplastos, Amaranto)	<u>emb CAP08852.</u> <u>1 </u>	31,2	100	0,48
LENAIDKK (L.LENAIDKK.Y)			35,4	100	0,022

<b>SSEDIKE</b> (Q.SSEDIKE.V)	Hypothetical protein OsJ_02756 [Oryza sativa subsp. Japónica] (Arroz)	<a href="#">gb EEE55056.1 </a>	31,2	100	0,47
<b>SIDEDAGE</b> (L.SIDEDAGE.A)	Heat shock cognate protein 80 [Glycine soja] (proteína de shock térmico, soja)	<a href="#">gb KHN43913.1 </a>	33,3	100	0,11
<b>KEISDDEDEE</b>			35,8	100	0,0016
<b>GKVEDVDEE</b> (E.GKVEDVDEE.K)			38	100	0,004
<b>MADVQMAEAE</b>	Heat shock protein 83-like [Solanum tuberosum] (proteína de shock térmico, papa)	<a href="#">ref XP_0063626 64.1 </a>	36,7	100	0,008
<b>EALNDEE</b>	Hypothetical protein OsJ_15636 [Oryza sativa Japonica Group] (Arroz)	<a href="#">gb EAZ31499.1 </a>	25,7	100	0,016
<b>EGGDEIKE</b> (E.EGGDEIKE.A)	14-3-3 protein [Triticum aestivum] (trigo)	<a href="#">gb AAR89812.1 </a>	34,1	100	0,054
<b>DDGADEIK</b> (Q.DDGADEIK.E)	14-3-3-like protein [Glycine soja] (Soja)	<a href="#">gb KHN26095.1 </a>	35	100	0,026
<b>QDDGADEIK</b> (M.QDDGADEIK.E)			39,7	100	8e-04
<b>ISDDEDDEPK</b>	Heat shock protein 83-like [Eucalyptus grandis] (proteína de shock térmico, Eucalyptus)	<a href="#">ref XP_0100595 69.1 </a>	35,8	100	0,014
<b>ISDDEDDEPKKE</b>			42,2	100	1e-04
<b>IAEDDPDEANDK</b>	Hypothetical protein POPTR_0005s26260 g [Populus trichocarpa] (álamo negro)	<a href="#">ref XP_0023077 32.1 </a>	48,1	100	2e-06
<b>IAEDDPDEANDKD K</b>			41,8	100	2e-04



Los aminoácidos que se encuentran antes y después de un punto, en la secuencia indicada entre paréntesis en la Tabla 13, son potenciales aminoácidos que no pudieron ser confirmados en el proceso de secuenciación por UHPLC/ ESI-MS (Sección 3.1). Los péptidos así ampliados se utilizaron con el objetivo de optimizar los valores de E-valor en la identificación proteica en NCBI.

Dado que las secuencias LENAIDK y LENAIDKK se alinearon en proteínas de *Amaranthus praetermissus*, se realizó una nueva búsqueda en la base de datos de NCBI, pero ahora restringida al género de Amaranto (***Amaranthus***) (Tabla 14):

**Tabla 14. . Resultado de la búsqueda de la secuencias peptídicas LENAIDK y LENAIDKK en la base de datos NCBI, restringida al género *Amaranthus*, mediante el uso de BLAST.**

Péptidos	Especie/ características	Secuencia (ID)	Score	Identidad (%)	E-valor
LENAIDK	Maturase K [ <i>Amaranthus praetermissus</i> ] (enzima implicada en la fotosíntesis en cloroplastos, Amaranto)	<a href="#">emb CAP08852.1 </a>	31,2	100	0,003
LENAIDKK			28,2	100	4e-04

En las Tabla 13 y Tabla 14, el E-valor indica la significancia estadística del alineamiento, es una medida de cuántos alineamientos con el mismo grado de similitud de secuencia se esperaría que se produzcan al azar, para una base de datos de un determinado tamaño. Por lo que, un valor bajo de E-valor ( $10^{-3}$ ) determina una alta significancia en el alineamiento de nuestra secuencia con la proteína candidata.

Con el objetivo de potenciar la identificación de las proteínas candidatas, las 16 secuencias peptídicas se agruparon para la búsqueda en la base de datos NCBI. Péptidos de diversas fracciones (F6-F16) pueden alinearse en diferentes secuencias de la misma proteína. De esta manera es más favorable considerar a una proteína identificada como válida cuando se tienen dos o más péptidos con buenas puntuaciones de E-valor.

En conclusión, los 16 péptidos se alinearon en 10 proteínas pertenecientes a 8 especies diferentes (Tabla 13 y Tabla 14): coníferas, amaranto, arroz, soja, papa, trigo, eucaliptus y

álamo negro. Se decidió realizar la síntesis del péptido **LENAIDKK** (marcado en rojo en la Tabla 14), debido su alineamiento con la proteína maturase K perteneciente a *Amaranthus praetermissus* y con muy buena significación estadística (E-valor= 4e-04).

### 3.3.3 Determinación de la potencial actividad inmunomoduladora

Para determinar si los 16 péptidos obtenidos por secuenciación (Sección 3.3.1), provenientes de las cinco fracciones de M2, poseen potencial actividad inmunomoduladora, se utilizó la información contenida en la bases de datos BIOPEP (database of proteins and bioactive peptides) (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) (Minkiewicz, Dziuba et al. 2008), restringida a péptidos con actividad inmunomoduladora. Esta base presentaba al 22 de febrero del 2012, 75 péptidos con dicha actividad.

Los 16 péptidos secuenciados a partir de las fracciones F6, F9, F12, F13, F14 provenientes de M2, se alinearon con los 75 péptidos de BIOPEP utilizando el software EMBOSS Needle (Sección 3.2.2). Se obtuvieron 9 grupos (G1 - G9) conformados por un único péptido de la base de datos BIOPEP, y una o varias secuencias de los 16 péptidos secuenciados en el trabajo (Tabla 15). De esta manera, pudimos determinar aquellos péptidos de Amaranto que más se aproximaban en su secuencia, acorde al mayor score (calculado en base a la relación identidad/similitud), a los provenientes de la base de datos BIOPEP con actividad inmunomoduladora.

**Tabla 15. Conformación de grupos (G1-G9), por alineación de los péptidos BIOPEP con los secuenciados de Amaranto**

Grupo	Péptidos BIOPEP	Proteína BIOPEP	Péptidos F6-F14 (identidad/similitud)	Score	Bibliografía
G1	RKQDKR	IL-1ra	AVRNDDE (2/1)	10	(Wieczorek, Kluczyk et al. 1997)
G2	ENRKQDKRF	IL-1ra	LENAIDKK (3/0)	10	
G3	RETIESLSSEESI_ PEYK	$\beta$ -caseína humana	SIDEDAGE (3/1)	11	(Azuma, Nagaune et al. 1989)
			<b>SSEDIKE</b> (4/0)	17	
			DDGADEIK (2/2)	11	
			QDDGADEIK (2/2)	11	
			ISDDEDEPK (3/3)	18	

			ISDDEDDEPKKE (3/4)	17	
G4	RELEELNVPGEIV_ ESLSSEESITR	$\beta$ -caseína rata	EALNDEE (3/2) LENAIDK (2/2)	16 9	(Coste, Rochet et al. 1992)
G5	KNTMEHVSSSEE_ SIISQETYKQEKNM AINPSK	$\alpha$ S2- caseína rata	KEISDDEDEE (2/3)	12	
G6	ITDFQILE	IL-1	MADVQMAEAE (3/2)	15	(Siemion, Kluczyk et al. 1998)
G7	GKVLKKRR	IL-1	EGGDEIKE (2/2)	9	(Navolotska ya, Kovalitskay a et al. 2008)
G8	DSDPR	IgE	IADEDPDEANDK (3/0) <b>IADEDPDEANDKDK</b> (3/0)	12 10	(Hamburger 1975)
G9	RPKHPIKHQGLP_ QEVLENLLRF	$\alpha$ S1- caseína vaca	GKVEDVDEE (3/2)	11	(Lahov and Regelson 1996)

En base a la información volcada en la Tabla 15, se seleccionó el péptidos **SSEDIKE** para su síntesis, por su elevado score en el alineamiento (=17) con la secuencia del Grupo G3, y además teniendo siempre preferencia por secuencias cortas (Omkvist, Larsen et al. 2010) (Figura 20):

```

[xxRETIESLSSEESIPEYKxxxx]
      |.|.|.|
-----SSEDIKE-----

```

Figura 20. Alineación del péptido **SSEDIKE** de la fracción F12 con el péptido de la base de datos BIOPEP del grupo G3. La línea vertical conecta dos aminoácidos idénticos, y el punto indica la no similitud.

Por último, se seleccionó el péptido **IADEDPDEANDK** (marcado en rojo en la Tabla 15) para su síntesis, debido a su alineamiento con péptidos con probada capacidad inhibitoria de la respuesta inmune inmediata mediada por IgE (Test Prausnitz-Küstner) (Hamburger

1975), información importante para la aplicación en el modelo murino de alergia alimentaria, desarrollado en el Capítulo III.

### 3.3.4 Determinación de secuencias consenso

Se diseñaron secuencias peptídicas constituidas con aminoácidos consensos, provenientes de alineaciones múltiples entre los 16 péptidos de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 (Sección 3.2.3). Este procedimiento nos proporcionó información acerca de las características de los alineamientos y el nivel de conservación de cada uno de los aminoácidos que conforman la secuencia. Se utilizó el programa ClustalW2 (Sección 3.2.3) y se obtuvieron 2 péptidos con el mayor puntaje posible: SD(E/D)DADE y DNDEE:

El péptido consenso de 7 aminoácidos **SD(E/D)DADE** es el resultado de la alineación de 4 péptidos (DDGADEIK, ISDDEDEPK, SIEDAGE, SSEDIKE), el aminoácido entre paréntesis significa que cualquiera de las 2 opciones es válida (Figura 21). El otro péptido consenso **DNDEE** posee una longitud de 5 aminoácidos y es el resultado de la combinación de 4 péptidos (KEISDDEDEE, GKVEDVDEE, AVRNDDE, EALNDEE) (Figura 21).

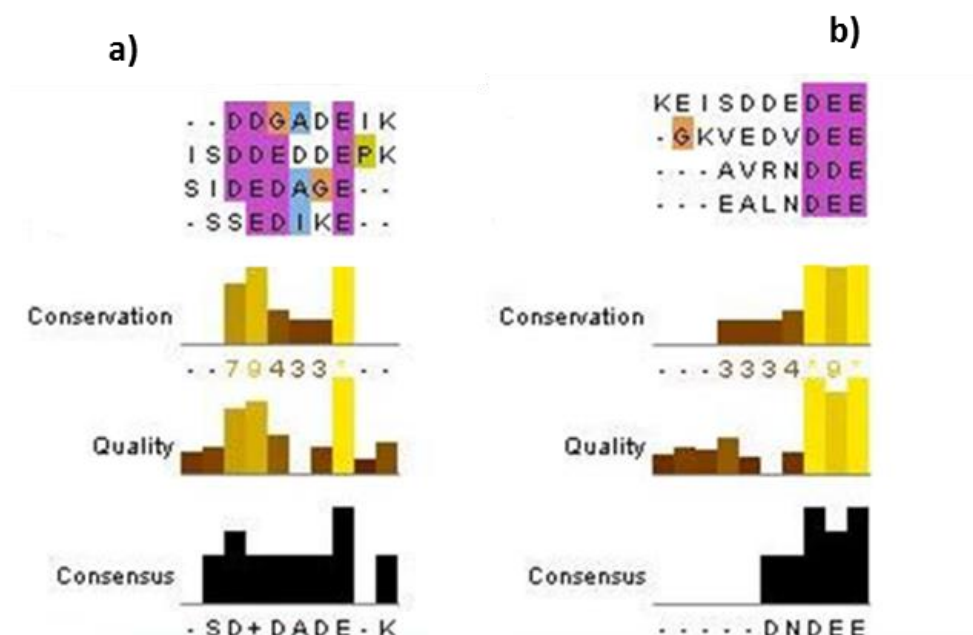


Figura 21. Secuencias consenso a) SD(E/D)DADE y b) DNDEE, a partir de los 16 péptidos de F6, F9, F12, F13 y F14 de Amaranto.

De los 2 posibles péptidos SD(D/E)DADE y DNDEE, se eligió éste último para su síntesis, debido a que posee mayor score de consenso y presenta una menor cantidad de aminoácidos en su secuencia, importante para el transporte transcelular (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008), desarrollado en el Capítulo II.

Haciendo la salvedad, que estos péptidos consensos no son estrictamente secuencias de Amaranto, dado que fueron modelados a través de herramientas bioinformáticas, pero que igualmente revisten gran interés.

### 3.3.5 Síntesis peptídica en fase sólida (SPPS)

En base a lo mostrado anteriormente, se seleccionaron una serie de péptidos para su síntesis mediante la técnica de Síntesis Peptídica en Fase Sólida (SPPS) (Sección 3.3).

Teniendo en cuenta la homología con proteínas de Amaranto, proveniente de la base de datos NCBI, con muy buen valor de significación estadística ( $E\text{-valor}=4e-04$ ), se sintetizó el péptido **LENAIDKK** (P1) (Sección 3.3.2).

Además, se decidió la síntesis del péptido **SSEDIKE** (P2) (Sección 3.3.3) en base al score obtenido ( $=17$ ) a partir de la similitud/identidad de su alineamiento con secuencias peptídicas de las de la base de datos BIOPEP.

Por otra parte, se realizó la síntesis del péptido **IADEDPDEANDK** (P3) dado su alineamiento con péptidos con capacidad inhibitoria de la respuesta inmune mediada por IgE (test Prausnitz-Küstner) (Hamburger 1975) (Sección 3.3.3), dato importante para el modelo murino de alergia alimentaria, desarrollado en el Capítulo III.

En base al procedimiento de obtención de secuencias consensos (Sección 3.3.4) por alineamiento múltiple, se decidió la síntesis del péptido **DNDEE** (P4).

Por último, se sintetizó el péptido **KPV** (P5), debido a su probada acción inmunomoduladora (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008), importante en el desarrollo del Capítulo II.

En la Tabla 16 se detallan los 5 péptidos (P1-P5) seleccionados.

Tabla 16. Características de los péptidos sintetizados

Nombre	Secuencia peptídica	Fracción muestral	Proteína BIOPEP	Proteína NCBI
P1	<b>LENAIDKK</b>	F9	IL-1ra	Maturase K [Amaranthus praetermissus] (enzima implicada en la fotosíntesis en cloroplastos, Amaranto)
P2	<b>SSEDIKE</b>	F12	$\beta$ -caseína humana	Hypothetical protein OsJ_02756 [Oryza sativa subsp. Japónica] (Arroz)
P3	<b>IADEDPDEANDK</b>	F14	IgE	Hypothetical protein POPTR_0005s26260g [Populus trichocarpa] (álamo negro)
Nombre	Secuencia peptídica	Características		Bibliografía
P4	<b>DNDEE</b>	Secuencia consenso		Sección 3.3.4
P5	<b>KPV</b>	Secuencia control (inmunomoduladora)		(Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008)

## 4. Conclusión

---

El objetivo del presente Capítulo fue la obtención de péptidos purificados a partir de una muestra compleja. Se partió de las semillas *Amaranthus hypochondriacus*, se sometieron a procesos de molienda y tamización, seguida de extracción alcalina y precipitación isoelectrica, obteniéndose la muestra **AI**. Constituida esta última, principalmente por globulinas de almacenamiento y en menor proporción por albúminas.

Las muestras **AH23 y AH30** se obtuvieron por una extensa hidrólisis de péptidos y proteínas por la acción de alcalasa a partir de AI, que dió origen a una gran cantidad de péptidos con secuencias aminoácidas cortas. Alcanzándose una elevada desnaturalización proteica, del orden del 88% para las albúminas, y del 70% para globulinas. Conservándose los polipéptidos básicos de globulina-11S en la región  $19-23 \pm 1$  kDa, en los perfiles electroforéticos de Tricina SDS-PAGE.

Se obtuvieron 80 fracciones (M1-M80) por separación en componentes peptídicos mediante cromatografía preparativa RP-HPLC de AH30. Del total de péptidos obtenidos, se eligieron las fracciones M1 y M2 para continuar con la separación por cromatografía analítica RP-HPLC, fraccionándose en 15 muestras (**F1-F15**). Las fracciones **F6, F9, F12, F13 y F14**, provenientes de M2 se secuenciaron mediante Nano cromatografía/ Espectrometría de masa (UHPLC/ ESI-MS), obteniéndose 16 péptidos: **AVRNDDE, LENAIDK, LENAIDKK, SSEDIKE, SIDEDAGE, KEISDDEDEE, MADVQMAEAE, EALNDEE, EGGDEIKE, DDGADEIK, ISDDEDEPK, ISDDEDEPKKE, QDDGADEIK, GKVEDVDEE, IAEDDPDEANDK, IAEDDPDEANDKDK**.

Aplicando herramientas bioinformáticas sobre los 16 péptidos identificados, se seleccionaron 4 para su síntesis (LENAIDKK, SSEDIKE, IAEDDPDEANDK, DNDEE). El péptido **LENAIDKK** (P1) por su alineamiento con la enzima maturasa K de *Amaranthus praetermissus* (E-valor =  $4e-04$ ) perteneciente a la base de datos NCBI. El péptido **SSEDIKE** (P2) por su elevada similitud/identidad con una secuencia proveniente de la base de datos BIOPEP (score =17). El péptido **IAEDDPDEANDK** (P3) por su alineamiento con péptidos con capacidad inhibitoria de la respuesta inmune inmediata (test Prausnitz-

Küstner), provenientes de la base de datos BIOPEP. La secuencia consenso **DNDEE** (P4), surgida de la combinación múltiple de 4 péptidos secuenciados del *Amaranthus hypochondriacus* (KEISDDEDEE, EALNDEE, AVRNDDE, GKVEDVDEE. Además, se sintetizó el péptidos **KPV** (P5), descrito en la bibliografía con probada capacidad inmunomoduladora (Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008).





## ***Capítulo II: Capacidad moduladora de la respuesta inmune innata***

---

# 1. Introducción

---

## 1.1 Capacidad inmunomodulatoria *in vitro* e *in vivo* de péptidos de amaranto

En los últimos años, se ha reportado que los transportadores de oligopéptidos de membrana, como el transportador PepT1, pueden desempeñar un papel importante en la modulación de la inflamación intestinal. Se ha demostrado que di/tripéptidos se unen al transportador PepT1, y posteriormente modulan respuestas proinflamatorias (Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008, Bettenworth, Buyse et al. 2011, Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012). Estos trabajos demuestran que la administración de péptidos por vía oral permite controlar la colitis en ratón. Estos resultados resultan relevantes al momento de considerar el empleo de péptidos de amaranto para el tratamiento de enfermedades inflamatorias que afectan el intestino, como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) o las alergias alimentarias.

En el presente Capítulo, mostramos los resultados del estudio del transporte transepitelial de péptidos derivados del amaranto a través células epiteliales intestinales (Caco-2) e identificamos péptidos con actividad inmunomodulatoria *in vitro* en células Caco-2 y Caco-2 ccl20:luc (Bandyopadhaya et al. 2007; Romier et al. 2008). Posteriormente, en el Capítulo III, se empleará el modelo murino de alergia alimentaria desarrollado en ratones BALB/c para investigar el efecto anti-inflamatorio *in vivo*.

## 1.2 Transportador peptídico transepitelial PepT1

La absorción de los péptidos provenientes de la dieta se produce a través de transportadores de oligopéptidos ubicados en la cara apical de las células epiteliales intestinales (IEC). Un ejemplo bien caracterizado es el transportador PepT1, co-transportador de péptidos y  $H^+$  (Steel, Nussberger et al. 1997) (Figura 22).

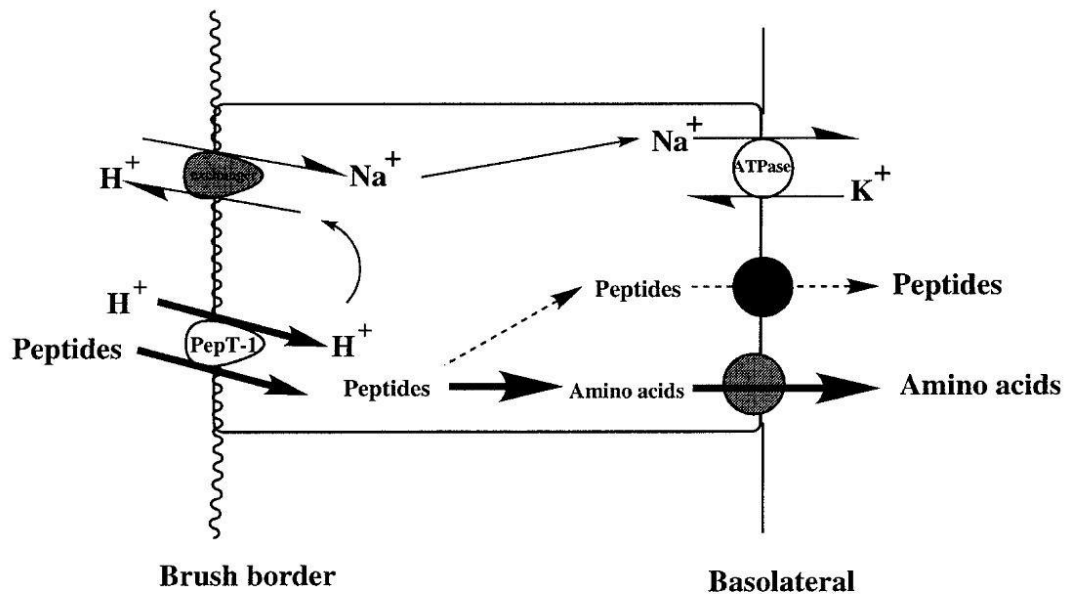


Figura 22. Transportador intestinal de oligopéptidos PepT1 (Adibi 1997)

La especificidad de PepT1 es excepcionalmente amplia e incluye la mayoría de los di y tripéptidos, además de diversos péptidos derivados de drogas, pero es incapaz de transportar aminoácidos libres y tetrapéptidos (Adibi 1997, Adibi 2003, Omkivist, Larsen et al. 2010). El PepT1 se expresa principalmente en los enterocitos del intestino delgado en la cara apical que contiene borde en cepillo (*brush border*), en las células tubulares proximales del segmento S1 del riñón, y en las células epiteliales del conducto biliar (Rubio-Aliaga and Daniel 2008). En las células epiteliales de colon humano, la expresión de mRNA de PepT1 y su síntesis proteica es baja o nula en homeostasis, aunque se ha observado una expresión incrementada en pacientes con EII (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) (Merlin, Si-Tahar et al. 2001), por causas que se desconocen. Una hipótesis posible sería que la sobreproducción de péptidos pro-inflamatorios provenientes de bacterias, induciría una mayor expresión del transportador (Ingersoll, Ayyadurai et al. 2012). Además, se ha observado que el transportador PepT1 se expresa en macrófagos que están en contacto estrecho con la lámina propia del intestino (Charrier, Driss et al. 2006). Dado que estos péptidos presentan propiedades anti-inflamatorias, y que la expresión del transportador PepT1 en colon es estimulada por procesos inflamatorios (EII), se podría especular que esto constituye un mecanismo compensatorio del tejido para controlar el proceso inflamatorio local. Por lo tanto, consideramos que es relevante investigar los factores que regulan su expresión, para diseñar terapias anti-inflamatorias

basadas en la expresión de estos receptores en las células inflamatorias. Además, se está investigando el empleo de péptidos anti-inflamatorios específicos de PepT1. El tripéptido KPV (Lys-Pro-Val) es la secuencia C-terminal de la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH) (Hiltz and Lipton 1989, Kelly, Moir et al. 2006), muestra afinidad por PepT1 y ejerce un efecto anti-inflamatorio en ratones tratados con DSS o ácido 2,4,6 trinitrobencensulfónico, ambos modelos de colitis inducida (Bettenworth, Buyse et al. 2011) (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008). Aunque los mecanismos subyacentes no se conocen con exactitud, se sabe que el péptido KPV inhibe la vía de activación NF- $\kappa$ B, que conlleva a la inhibición de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. Estudios recientes demuestran que el intestino de ratones y humanos, presentan niveles comparativos de expresión del transportador PepT1 (Kim, Park et al. 2007).

### 1.3 Flagelina como estimulador de la inmunidad innata

El flagelo bacteriano es un apéndice móvil presente tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-) y contribuye a su virulencia a través de la quimotaxis, la adhesión e invasión celular. El flagelo, formado por monómeros de **flagelina**, constituye un filamento que rota en forma helicoidal y se encuentra “anclado” a la pared bacteriana a través de una estructura proteica conocida como “gancho” (hook). En base a un modelo estructural, la flagelina se puede diferenciar en cuatro dominios globulares (Ramos, Rumbo et al. 2004): los dos primeros dominios (D0 y D1) son conservados en distintos microorganismos, y se ubican hacia el interior del flagelo, responsables del ensamblaje para formar el flagelo (Kanto, Okino et al. 1991). Los dos dominios restantes (D2 y D3) se ubican hacia el exterior del flagelo, y se trata de secuencias hipervariables, tanto en tamaño como en composición al compararlos con diferentes microorganismos, resultando por lo tanto altamente inmunogénicos (Figura 23).

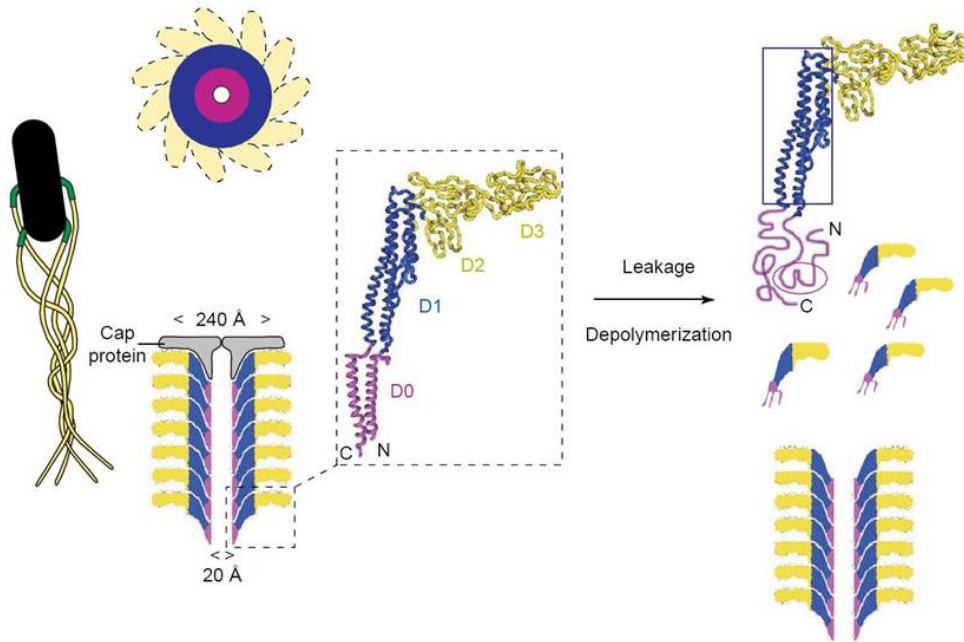


Figura 23. . Estructura y organización del flagelo y filamento flagelar. La figura en recuadro describe la estructura de la flagelina (dominios globulares D0, D1, D2 y D3), el dominios D0 comprende parte de los extremos N- y C-terminal. (Ramos, Rumbo et al. 2004)

En los huéspedes mamíferos, los dominios conservados (D0 y D1) presentan afinidad por la región extracelular del receptor Toll-like 5 (TLR5), desencadenando en la célula blanco la activación de la vía de NF- $\kappa$ B y la consiguiente activación celular. Este reconocimiento constituye uno de los principales mecanismos de la inmunidad innata para reconocer microorganismos flagelados (*Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* flagelados) y de esta manera activar esta rama temprana de la inmunidad. También se ha visto que la interacción flagelina-TLR5 es importante en patologías inflamatorias como la Enfermedad de Crohn (Vijay-Kumar and Gewirtz 2009). En este caso la alteración de la barrera epitelial expone las células de la inmunidad innata a los microorganismos de la microbiota. Es común observar en estos pacientes anticuerpos anti-flagelina, producto del contacto entre las células del sistema inmune y bacterias flageladas presentes en el lumen intestinal (Lodes, Cong et al. 2004).

#### 1.4 Receptor TLR5

Los receptores tipo Toll (TLRs, Toll-like receptors), son receptores transmembrana que participan en la inmunidad innata. Pertenecen a una familia de receptores de

reconocimiento de patrón (PRRs, pattern recognition receptors) que se unen a patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs, microorganism-associated molecular patterns). Los MAMPs sólo se encuentran presentes en procariotas, constituyen estructuras bien conservadas ya que son importantes para mantener su vitalidad.

Los TLRs en conjunto con los receptores de IL-1 forman una súper familia, dado que poseen un mismo dominio citosólico TIR (Toll/ IL-1 receptor), encargado de iniciar la transducción de señales. Además presentan un dominio extracelular rico en secuencias repetitivas de leucinas (leucine rich repeat, LRR) encargado de la interacción con los MAMPs. Hasta el presente, han sido descritos 12 TLR funcionales en ratones y 11 en humanos, siendo TLR-1 a TLR-9 conservados entre especies.

Los dominios globulares D0 y D1, altamente conservados entre las distintas flagelinas, son reconocidos por la región extracelular del receptor Toll-like 5 (TLR5), desencadenando una cascada de señalización que culmina con la activación de la respuesta inmune innata.

La señalización a través de TLR5 comienza cuando la flagelina interactúa con la región extracelular del LRR, luego de lo cual el dominio TIR en la región intracelular dispara una cascada de fosforilación a través de la proteína adaptadora MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) que recluta a la kinasa IRAK (interleukin – 1 receptor associated kinase). La vía de señalización prosigue con la fosforilación del complejo I $\kappa$ B kinasa (IKK, inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) que fosforila a la subunidad I $\kappa$ B- $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha, IKK- $\alpha$ ), la cual bloquea a los componentes de NF- $\kappa$ B y evita que se transloquen al núcleo. La fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  prosigue con su ubiquitinación (unión de monómeros de ubiquitina), lo cual determina su procesamiento y degradación en el proteosoma citosólico. De esta manera, el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) es traslocado al núcleo, para promover la expresión de genes que median la respuesta pro-inflamatoria, entre ellos la quimioquina CCL20 (Chemokine (C-C motif) ligand 20) (Jenner and Young 2005) (vía 5a de la Figura 24).

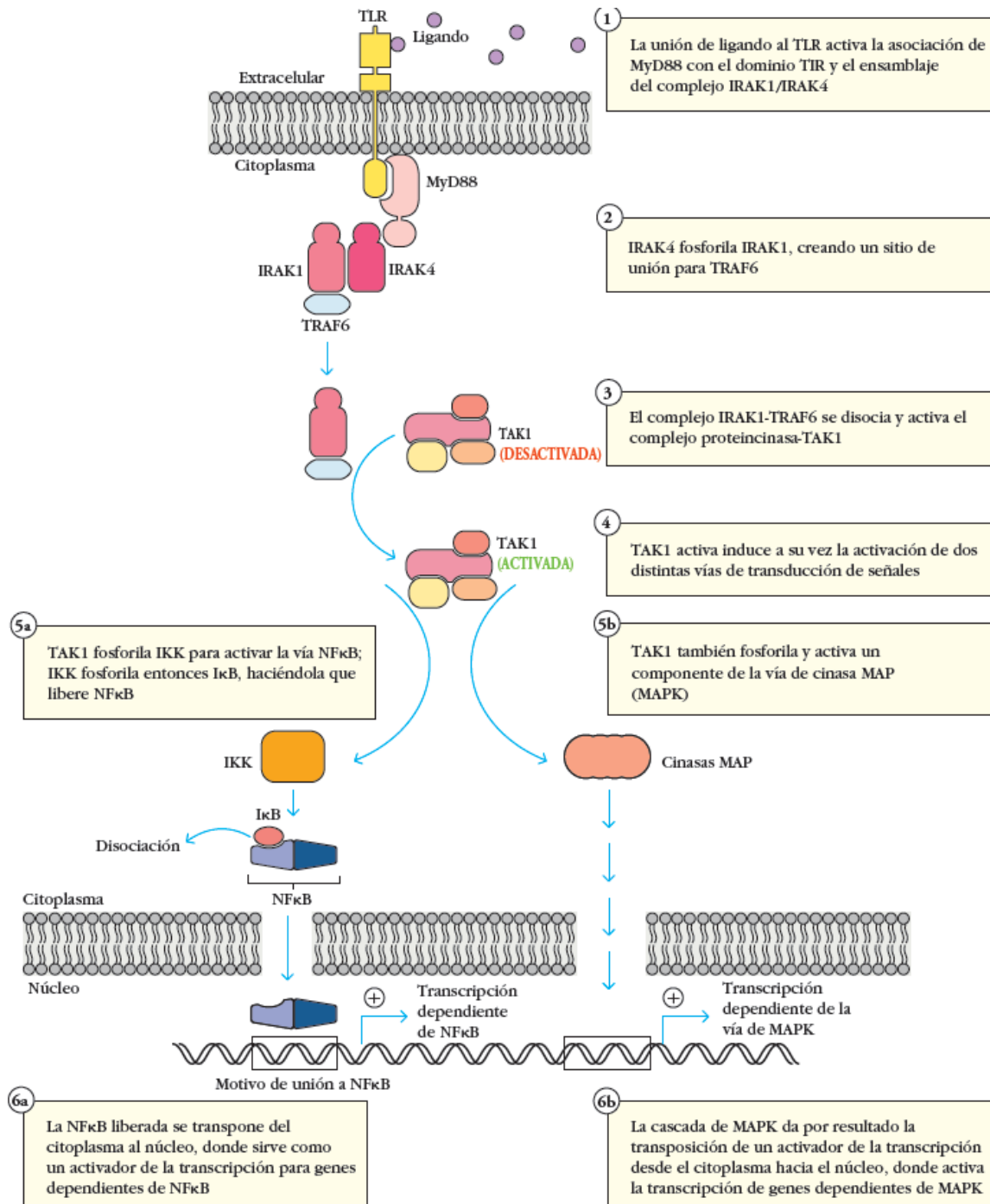


Figura 24. Vía de señalización intracelular por TLR (Kindt, Goldsby et al. 2007).

La expresión de TLR5 en el epitelio gastrointestinal está localizada tanto en el lado apical como basolateral de las células epiteliales. Lo descrito anteriormente corresponde a los TLR5 basolaterales. Cuando flagelina es reconocida por los TLR5 apicales en lugar de inducir la activación celular se induce la inhibición celular, por mecanismos aún no



dilucidados. Por lo tanto la expresión y función de los TLR5 no es homogénea en las diferentes caras del enterocito, y esto determina que la célula se active cuando la bacteria penetra la barrera epitelial (patógeno) o no se active cuando el contacto se produce por la cara apical (bacteria saprófita del lumen intestinal). Durante un proceso inflamatorio, disminuyen los niveles de expresión del receptor y la distribución se torna netamente basolateral (Takeda and Akira 2005).

## 1.5 Quimioquina CCL20

La estimulación del receptor TLR5 induce una respuesta temprana (horas), en la que se destaca la expresión de CCL20 (Jenner and Young 2005). Esta quimioquina es un fuerte atrayente de linfocitos y células dendríticas para iniciar la respuesta adaptativa (Izadpanah, Dwinell et al. 2001). Por lo tanto, su nivel de expresión constituye un excelente indicador de la activación de la respuesta inmune innata inflamatoria en distintos órganos, especialmente en la mucosa intestinal (Sierro, Dubois et al. 2001). La modulación de la expresión de esta quimioquina puede plantearse como una terapia anti-inflamatoria en aquellas patologías que cursan con una respuesta inflamatoria exacerbada. En este Capítulo se mostrarán los resultados obtenidos de las líneas celulares de colon humano Caco-2 y Caco-2 ccl20:luc (línea reportera que produce la enzima luciferasa y la quimioquina CCL20, frente a la activación de la vía de NF- $\kappa$ B), al exponerlas a flagelina para su activación celular, lo cual se evidencia a través de la expresión de CCL20 (Bambou, Giraud et al. 2004).

## 1.6 Línea reportera Caco-2 ccl20:luc

Se evaluó la capacidad anti-inflamatoria de los péptidos provenientes de amaranto sobre células activadas con flagelina (FliC). Para ello, se utilizó la línea reportera Caco-2 ccl20:luc, son células del epitelio intestinal Caco-2 transfectadas en forma estable mediante el plásmido que contiene el gen de la luciferasa (luc) de luciérnaga (*Lampyrus noctiluca*), bajo el control del promotor NF- $\kappa$ B de CCL20 (Sección 5.2). Este sistema permite evaluar con alta sensibilidad la respuesta pro-inflamatoria por el estímulo con FliC, mediante la emisión de luz al incubar el extracto celular con un sustrato. La inducción del gen luciferasa es producto de la activación de la vía de vía NF- $\kappa$ B cuando la célula es activada a través de sus receptores de inmunidad innata. En este caso en

particular, FliC induce la activación de la vía de señalización intracelular a través del TLR5, lo cual genera, entre otros efectos, la expresión y secreción de CCL20 y la inducción de luciferasa (Anderle, Rumbo et al. 2005, Nempont, Cayet et al. 2008). Por consiguiente, la síntesis de la enzima luciferasa está vinculada directamente con la expresión del gen CCL20, y su actividad enzimática es cuantificada por una reacción de bioluminiscencia.

## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivo general

La objetivo general del presente Capítulo es estudiar la capacidad moduladora de la respuesta inmune innata, por proteínas/péptidos de *Amaranthus hypochondriacus*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudiar la capacidad moduladora mediante el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc.
- Estudiar el efecto modulador a través de la expresión de mRNA y síntesis de la citoquina CCL20.
- Estudiar el transporte transepitelial en células intestinales.

## 3. Resultados

---

### 3.1 Obtención y caracterización de flagelina (FliC)

#### 3.1.1 Obtención de FliC

Las muestras de flagelina (FliC) se obtuvieron a partir de los flagelos de *Salmonella entérica* serotipo *typhimurium* SIN22, se detoxificaron por duplicado y posteriormente se determinaron los valores de LPS, como se indicó previamente (Sección 6). Se hizo un pool con los distintos preparados que dieron un ensayo LAL negativo y se concentraron por liofilización, conservándose a -80°C hasta su posterior uso. Inicialmente, parte de la FliC fue suministrada por Dra. Yanina Hiriart (Hiriart, Errea et al. 2012).

#### 3.1.2 Caracterización de FliC

La concentración proteica de la muestra flagelina (FliC) se determinó por el método del Lowry (Sección 2.4.3). Se solubilizó en H<sub>2</sub>O apirógena. Se obtuvo una concentración de  $4,29 \pm 0,21$  mg/mL de proteína.

La pureza de FliC se evaluó mediante electroforesis Tricine SDS-PAGE con tinción con Coomassie Brilliant Blue (Cap. 1 Sección 3.2.7). El análisis del gel mostró una única banda de  $56 \pm 1$  kDa, que coincide con el peso molecular esperado para la flagelina, alcanzándose un grado de pureza satisfactorio (Figura 25) (Hiriart, Errea et al. 2012).

Se evaluó la capacidad de FliC de activar la respuesta inmune innata. Para ello, las células Caco-2 ccl20:luc se incubaron con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión por 4 hs (Sección 9.1). Posteriormente se midió la actividad de la enzima luciferasa en el lisado celular, obteniéndose valores de bioluminiscencia satisfactorios.

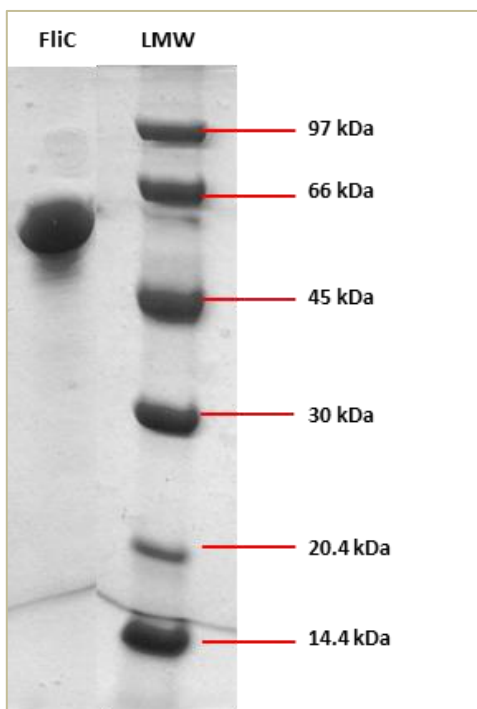


Figura 25. Electroforesis Tricine SDS-PAGE. En la muestra correspondiente a FliC se detectó una única banda, con el peso molecular de la flagelina.

## 3.2 Estudio de la capacidad moduladora de AI, AH23 y AH30

### 3.2.1 Inhibición dosis-respuesta de la actividad luciferasa

Se estudió el efecto de inhibición **dosis-respuesta** en la línea celular Caco-2 ccl20:luc. Se trataron en forma simultánea a las células con FliC (1,5 µg/mL) y con distintas concentraciones de AI, AH23 y AH30 en DMEM Adhesión. Se incubaron durante 4 hs y luego se midió la actividad de la enzima luciferasa en el lisado celular.

En la Figura 26 se observa el efecto dosis-respuesta para AH23 y más claramente para AH30, debido a que cuanto mayor es el grado de hidrólisis (%Gh) y mayor la concentración proteica, más importante es el descenso del %NAL. El efecto inhibitorio de las muestras hidrolizadas se traduce en una mayor inhibición de la actividad de la enzima luciferasa (inducida por FliC). Se realizaron controles sin agregado de FliC con el objetivo de demostrar que las muestras (2,5 mg/mL) no activaron las células.

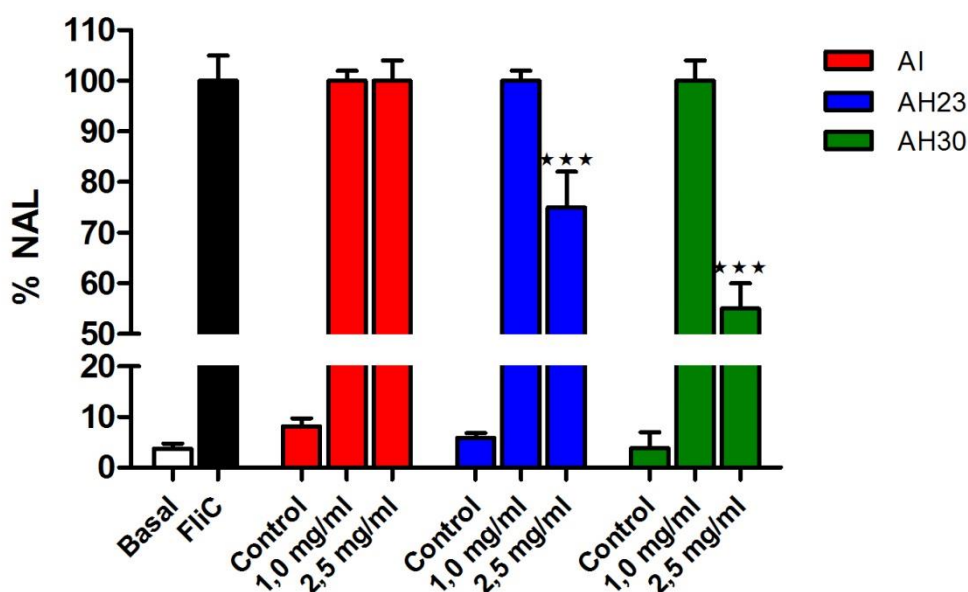


Figura 26. Efecto dosis-respuesta para las muestras AI, AH23 y AH30. Se realizaron controles (-): solo con DMEM Adhesión (Basal), y con las muestras (2,5 mg/mL) AI, AH23 y AH30 en DMEM Adhesión (Control). Control (+) solo con el agregado de FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión (FliC). Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado con el Control (+) (FliC). Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 3 experimentos representativos.

### 3.2.2 Efecto del pre-tratamiento en la modulación de la actividad luciferasa

A partir de los resultados anteriores, se decidió evaluar el efecto de pre-tratamiento en la inhibición de la activación celular. Para ello, las células Caco-2 ccl20:luc se incubaron por 1 y 2 hs con 2,5 mg/mL de AH30, luego se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron con PBS, y se incubaron por otras 4 hs con FliC (1,5 µg/mL). En paralelo, se realizó un Control Testigo, el cual se trató simultáneamente con 2,5 mg/mL de AH30 y FliC (1,5 µg/mL), durante 4 hs. Se realizó un control (+) sólo con FliC (1,5 µg/mL) (FliC) y dos controles (-), uno sólo con DMEM Adhesión (Basal) y otro con AH30 (2,5 mg/mL) sin FliC (Control), en todos los casos se incubó durante 4 hs.

En la Figura 27 se muestra el efecto modulador inducido por el pre-tratamiento de las células con las muestras. En la muestra correspondiente a una pre-incubación de 2 hs, se detectó un valor de ~70%NAL, siendo similar al resultado obtenido en el Control Testigo (sin pre-incubación). Esto nos indica que el pre-tratamiento con AH30, es suficiente para proteger la activación celular sin necesidad del contacto directo con el activador, manteniendo el cuadro preventivo hasta 2 hs.

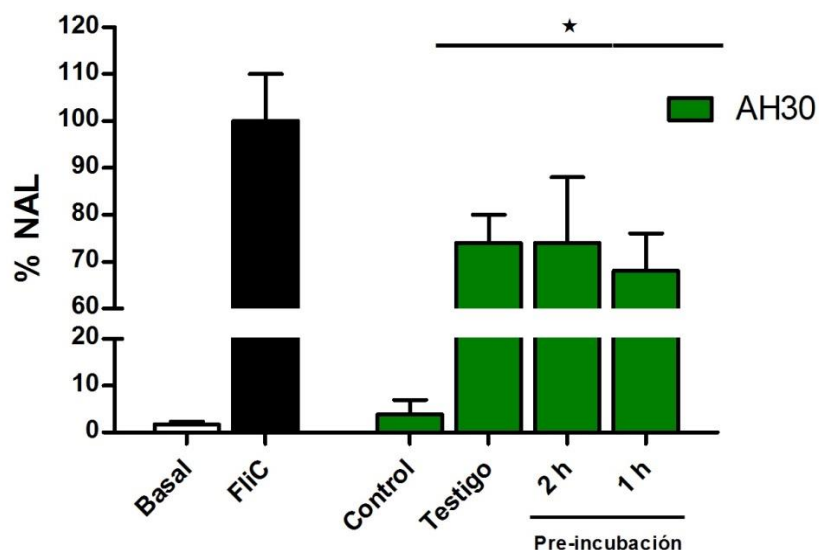


Figura 27. Efecto de pre-tratamiento con AH30 sobre Caco-2 ccl20:luc. Se realizaron controles (-) con DMEM Adhesión (Basal) y con AH30 (2,5 mg/mL) sin FliC (Control), un Control (+) con FliC (1,5 µg/mL) (FliC) y un Control con 2,5 mg/mL AH30 en simultaneo con FliC (1,5 µg/mL) (Testigo). Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Test Anova de una vía, seguido prueba Dunnett's (\* $p < 0,05$ ) comparado con el Control (+) FliC. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

De acuerdo a estos resultados el hidrolizado proteico induce un efecto en las células en reposo, que luego se traduce en un bloqueo de la activación FliC-dependiente.

### 3.2.3 Toxicidad celular por MTT, RN y LDH

Las muestras AI, AH23 y AH30 presentan cierta toxicidad para las células a medida que aumenta la concentración proteica o peptídica (Figura 28). El tratamiento de las células con 1,0 mg/mL y 2,5 mg/mL no mostró ser tóxico, obteniéndose valores del orden del Control (-) para los ensayos de RN, MTT, y LDH. Sin embargo, concentraciones mayores de AI, AH23 y AH30 (5,0 mg/mL), resultaron tóxicas para las células en los 3 tipos de ensayos utilizados, con valores cercanos al Control (+), incubados con detergente o etanol en DMEM Adhesión, provocando la lisis celular. La muerte celular total se alcanza a una concentración de 7,5 mg/mL (valores no mostrados en la figura).

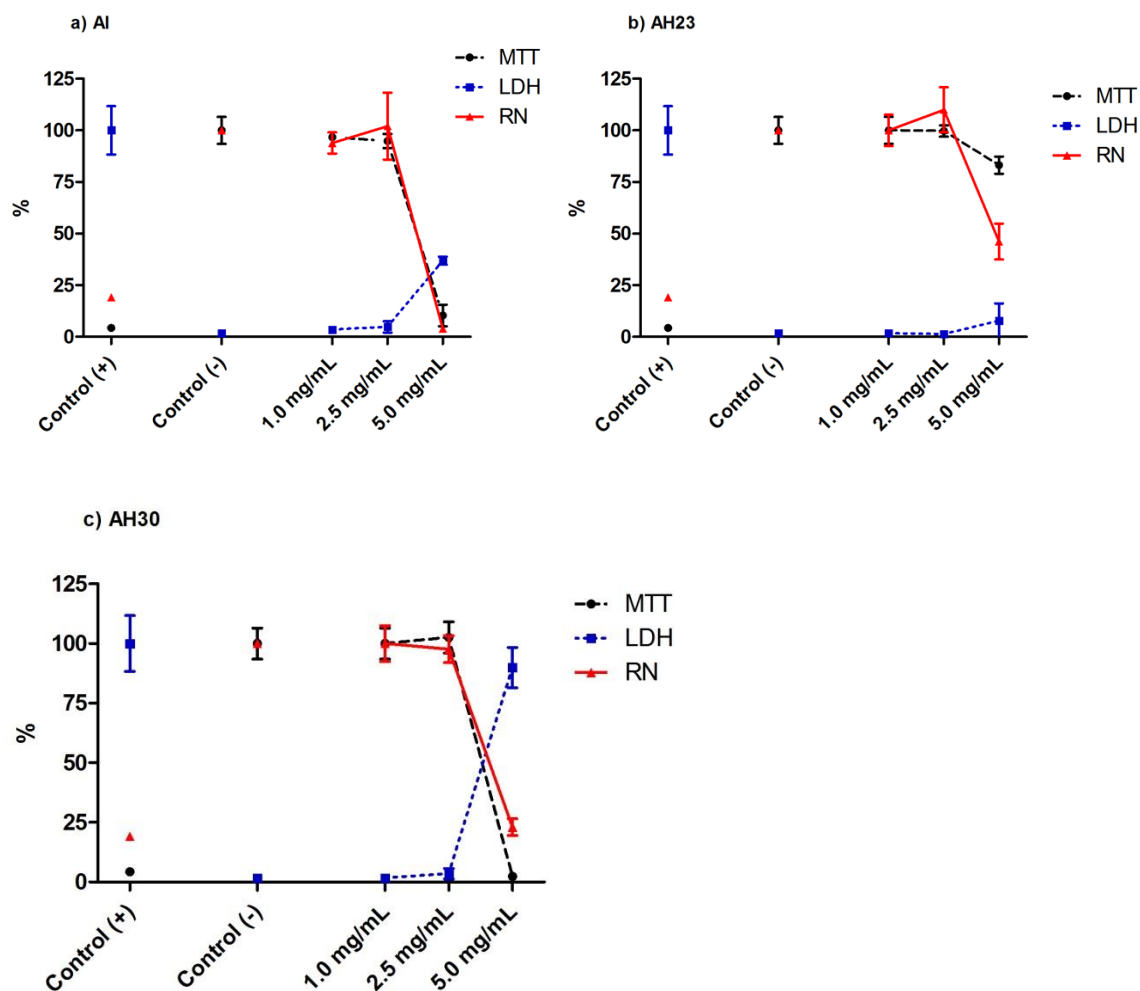


Figura 28. Ensayo de citotoxicidad celular por las técnicas de MTT, RN y LDH a las muestras a) AI, b) AH23 y c) AH30. Se realizaron 3 ensayos independientes. Control (-) para RN y MTT, y LDH, incubadas con FLiC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión, dando valores cercanos a 100% para MTT y RN, y de 0% para LDH. Control (+), incubados con detergente o etanol en DMEM Adhesión, provocando lisis celular. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

Estos resultados nos permiten concluir que para mantener la viabilidad celular óptima es necesario trabajar con concentraciones de hidrolizados  $\leq 2,5$  mg/mL.



### 3.3 Estudio de la capacidad moduladora de M1 y M2

#### 3.3.1 Modulación de la actividad luciferasa por el Segmento Hidrofílico, Intermedio e Hidrofóbico

Las muestras AH23 y AH30, fueron separadas en sus componentes mediante cromatografías RP-HPLC, en 3 intervalos de tiempo de elución: Segmento Hidrofílico, (Seg1) Segmento Intermedio (Seg2) y Segmento Hidrofóbico (Seg3) (Capítulo I, Sección 3.2.1). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:4 y 1:2 de los 3 Segmentos y se evaluó la capacidad moduladora en la línea reportera Caco-2 ccl20:luc por tratamiento en simultáneo con FliC.

Los valores de dilución 1:2 para el Seg1 y Seg3 de AH23 y de 1:2 para el Seg1 de AH30 no se incluyeron en las Figura 29, debido a que mostraron ser tóxicas para las células acorde a los resultados obtenidos en los ensayos MTT, RN y LDH (Sección 7).

En la Figura 29 a) correspondiente a AH23, se observó una disminución del  $19,14 \pm 5,09$  %NAL para la dilución 1:2 del Seg2. En la Figura 29 b) se presentan los resultados obtenidos con AH30, en este caso se detectó una disminución del  $36,57 \pm 6,91$  %NAL para la dilución 1:4 del Seg1; un descenso de  $24,23 \pm 4,5$  %NAL para la dilución 1:2 del Seg2 y del 25,15 % y 21,03 %NAL para la dilución 1:4 y 1:2, respectivamente, del Seg3.

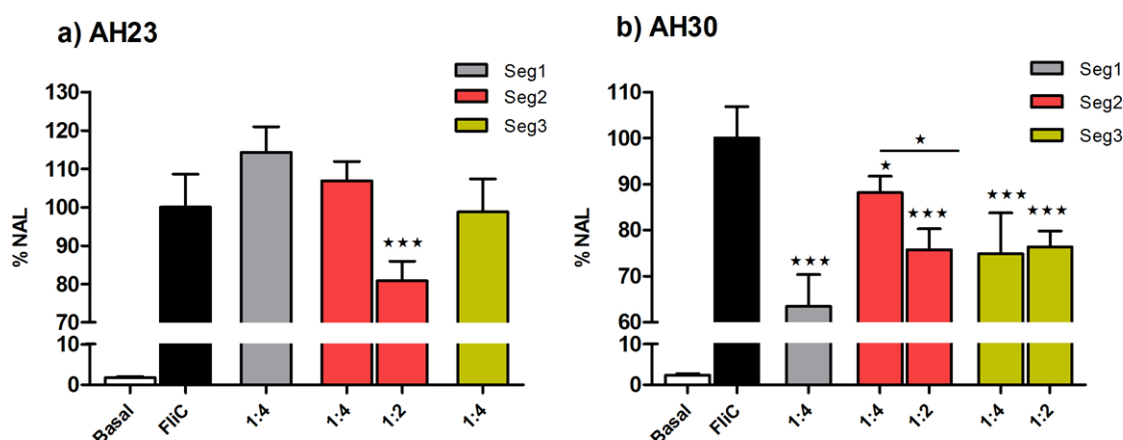


Figura 29. Efecto dosis-respuesta para las muestras Seg1, Seg2 y Seg3 de a) AH23 y b) AH30. Control (-) solo con DMEM Adhesión (Basal). Test Anova de una vía, seguido de prueba Tukey's (\*\*\*p<0,001,

(\* $p < 0,05$ ) comparado con el Control (+) FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos

En base a estos resultados podemos concluir que componentes presentes en la muestra AH30, en particular en el Seg1, obtenido por RP-HPLC, ejercen el mayor efecto inhibitorio de la activación FliC-dependiente. Por lo tanto, se decidió continuar con el estudio de la muestra AH30 en los ensayos posteriores.

### 3.3.2 Modulación de la actividad luciferasa por M1-M80, provenientes de AH30

En base a los resultados anteriores, se decidió fraccionar a la muestra AH30 por RP-HPLC en columna preparativa (Capítulo I, Sección 3.2.2). Se obtuvieron 80 muestras, recolectadas cada 0,6 min de elución, denominadas consecutivamente de M1 a M80. Posteriormente las 80 muestras se incubaron en forma individual con FliC (tratamiento simultaneo) con la línea reportera Caco-2 ccl20:luc, y se cuantificó la emisión de luz. Los resultados obtenidos muestran el mayor efecto inhibitorio para las fracciones: M1, M2, M4, M10, pertenecientes al Seg1, y para M19, M23, M24, M26, M32, M46, M49, pertenecientes al Seg2 (Figura 30).

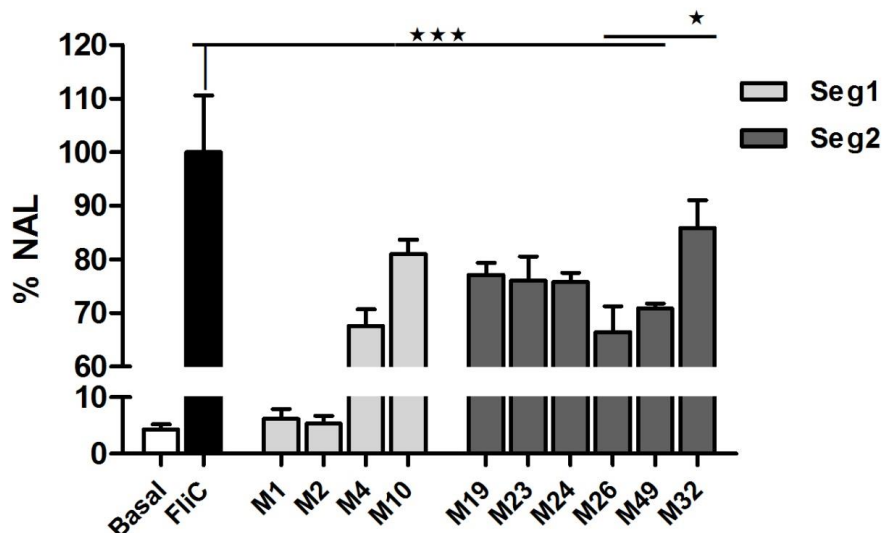


Figura 30. Tratamiento simultáneo de M1-M80 en Caco-2 ccl20:luc. Figuran solo las muestras que poseen valores de %NAL con diferencias significativas con respecto al Control (+).Control (-) solo con

DMEM Adhesión (Basal). Test Anova de una vía, seguido de prueba Tukey's (\*\*p<0,001, \*p<0,05) comparado con el Control (+) FliC (1,5 µg/mL). Los resultados se expresan como la Media ± SD. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

Las muestras M1 y M2 presentaron una importante modulación de la activación celular, con valores de  $6,18 \pm 1,73$  %NAL y  $5,35 \pm 1,37$  %NAL, respectivamente, cercanos al control (-) (Basal). Por lo tanto se decidió continuar trabajando con estas 2 fracciones cromatográficas.

### 3.3.3 Modulación de la actividad luciferasa y citotoxicidad por las fracciones M1 y M2

Dado que las fracciones M1 y M2 presentaron una clara inhibición de la actividad luciferasa (Sección 3.3.3), se realizó un tratamiento simultáneo de tipo dosis-respuesta empleando el sistema reportero.

La concentración proteica Inicial (1:1) fue de  $1,112 \pm 0,082$  mg/mL para M1 y de  $2,505 \pm 0,091$  mg/mL para M2, medida por la técnica de Lowry (M. y M. Sección 2.4.3). Se realizaron diluciones a la mitad (1:2) y a la décima parte (1:10) en DMEM Adhesión.

En la Figura 15 se puede observar el marcado efecto inhibitorio dependiente de la dosis utilizada. Se llegaron a obtener valores cercanos al control (-) (Basal), dado que en las muestras con menor dilución (1:1) se obtuvieron valores de  $11,87 \pm 1,82$  %NAL para M1 y de  $1,09 \pm 0,47$  %NAL para M2 (Figura 31).

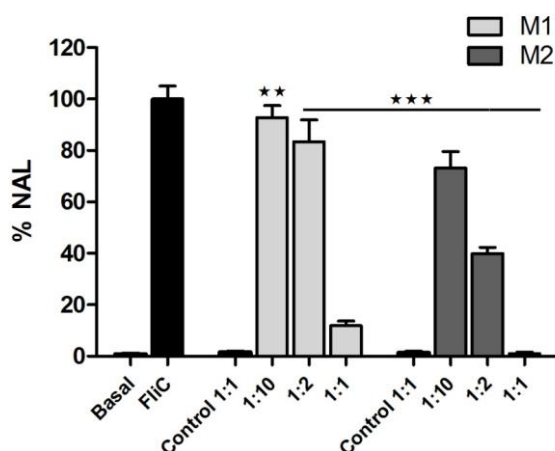


Figura 31. Tratamiento simultáneo dosis-respuesta para M1 y M2 en Caco-2 ccl20:luc. Concentraciones proteicas de M1: 1,112 mg/mL (1:1), 0,556 mg/mL (1:2) y 0,111mg/mL (1:10). Concentraciones proteicas

de M2: 2,505 mg/mL (1:1), 1,252 mg/mL (1:2) y 0,250mg/mL (1:10). Se realizaron Controles (-) de M1 y M2 sin diluir (1:1) en Caco-luc en DMEM Adhesión sin FliC (Control 1:1) y solo con DMEM Adhesión (Basal). Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's (\*\*p<0,001, \*\*p<0,01) comparado con el Control (+) FliC (1,5 µg/mL). Los resultados se expresan como la Media ± SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

En forma complementaria, a las muestras Iniciales (1:1) de M1 y M2 se les realizaron ensayos de citotoxicidad por LDH y MTT (Figura 32). Los valores obtenidos se encuentran dentro de los parámetros normales de viabilidad, siendo similares a los correspondientes al Control (-) para MTT y LDH (incubados con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión), indicando que es confiable trabajar con concentraciones de muestra iguales (1:1) y/o inferiores a este valor.

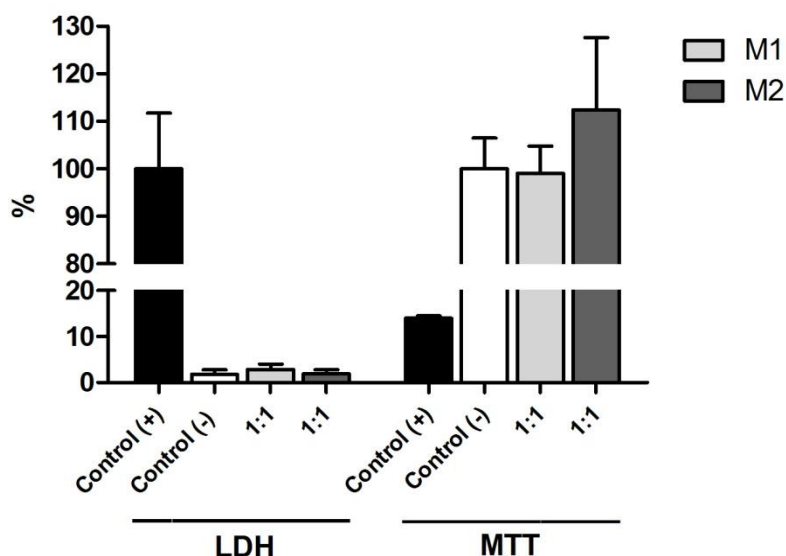


Figura 32. Ensayo de citotoxicidad en M1 y M1 por LDH y MTT en Caco-2 ccl20:luc. La concentración proteica de M1 y M2 iniciales (1:1) corresponden a  $1,112 \pm 0,082$  mg/mL y  $2,505 \pm 0,091$  mg/mL, respectivamente. Como Control (-), se incubó con FliC en DMEM Adhesión, dando valores cercanos a 100% para MTT y de 0% para LDH. Control (+), incubados con detergente o etanol en DMEM Adhesión, provocando lisis celular. Los resultados se expresan como la Media ± SD. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

### 3.4 Estudio de la capacidad moduladora de los péptidos P2 y P3

#### 3.4.1 Modulación de la actividad luciferasa por las fracciones F1-F15

Las muestras M1 y M2 se separaron en sus componentes mediante cromografía RP-HPLC por elución en columna analítica (Cap. 1. Sección 3.2.3). Se obtuvieron 15 fracciones (F1-F15) para cada muestra.

Se realizó un esquema de tratamiento en simultaneo con FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) con el sistema reportero (Figura 33), observándose modulación con algunas fracciones pertenecientes a M1 y M2 (no se determinaron sus concentraciones proteicas debido a la escasez de volumen de cada fracción).

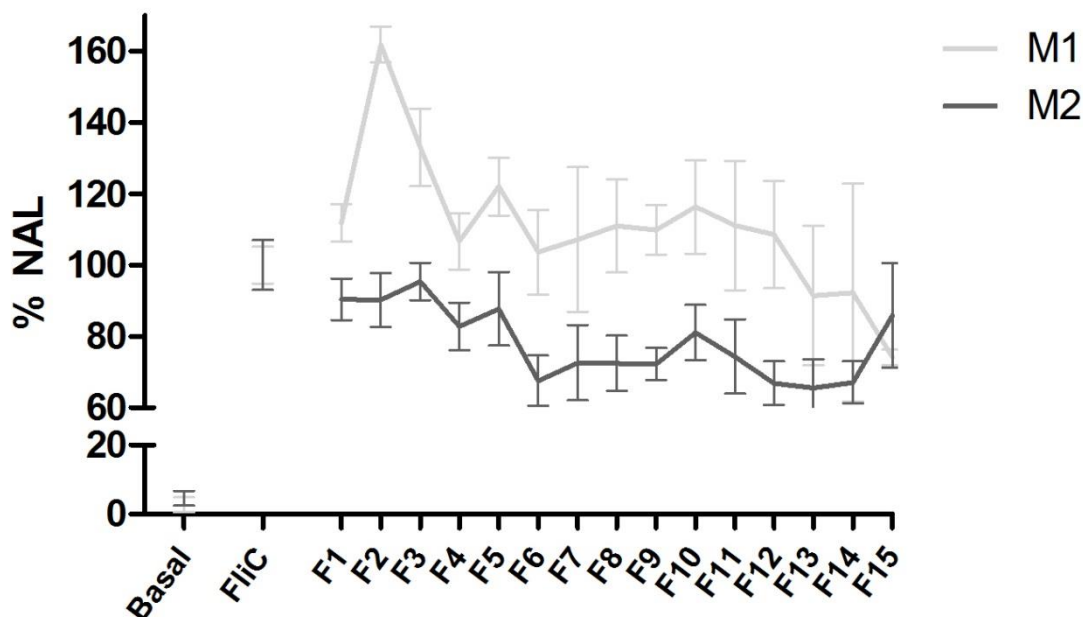


Figura 33. Ensayo de modulación de la actividad de la enzima luciferasa en Caco-2 ccl20:luc, de las fracciones F1-F15 de M1 y M2. Se realizó Control (-) solo con DMEM Adhesión (Basal) y Control (+) con 1,5  $\mu\text{g/mL}$  FliC (FliC). Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

En el caso de M1 solo se detectó inhibición para F15, mientras que en las demás fracciones se obtuvo escasa o nula modulación, debido posiblemente a la baja concentración de el/los péptidos activos por la separación de los componentes en las distintas fracciones.

Para M2, se obtuvo inhibición en las fracciones F6, F7, F8, F9, F11, F12, F13 y F14, siendo más importante en el caso de las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 (Figura 34).

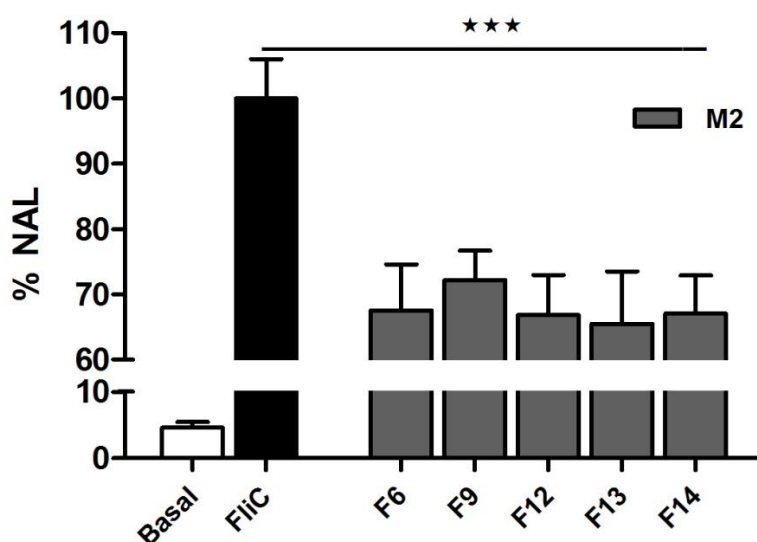


Figura 34. Ensayo de modulación de la actividad luciferasa en células Caco-2 ccl20:luc. Las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 provienen de la muestra M2. Se realizó Control (-) con DMEM Adhesión (Basal) y Control (+) con FliC 1,5 µg/mL (FliC). Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's (\*\*\*) comparado con el Control (+) FliC. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

En base a estos resultados, se decidió la secuenciación de los péptidos que componen las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14 provenientes de M2 por Nano cromatografía/ Espectrometría de masa (UHPLC/ ESI-MS). A partir de este ensayo se identificaron en las distintas fracciones a 16 péptidos (detalle de cada fracción en Cap. I Sección 3.3.1). Posteriormente se decidió realizar el tratamiento inhibitorio en simultáneo con los péptidos P1 (LENAIDKK), P2 (SSEDIKE) y P3 (IADEDPDEANDK).

### 3.4.2 Modulación de la actividad luciferasa y citotoxicidad, de los péptidos P2 y P3

En la Figura 35 se muestran los resultados de la inhibición de la actividad luciferasa en Caco-2 ccl20:luc en un tratamiento simultáneo empleando los péptidos P1 (LENAIDKK), P2 (SSEDIKE) y P3 (IADEDPDEANDK), secuenciados a partir de la fracción F9, F12 y F14, respectivamente. Se adicionó el péptido P5 (KPV) como Control Testigo, dada su conocida capacidad inmunomoduladora (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008). Las diferencias significativas indicadas en la Figura 35 corresponden a la comparación de los péptidos y sus combinaciones, con respecto al Control (+) FliC (1,5 µg/mL).

En la Figura 35 se puede observar que los péptidos P2 y P3 (200 µg/mL) presentaron actividad inhibitoria respecto al Control (+) FliC ( $***p<0.005$ ), excepto en el caso de P1. Además se determinó la existencia de inhibición dosis-respuesta para P2 y P3, en el rango de concentraciones 100 a 200 µg/mL ( $*p<0,05$ ).

Se observó un efecto sinergista al combinar distintos péptidos de a pares para una concentración de 100 µg/mL, con diferencias significativas en el caso de P3+P5 ( $**p<0,01$ ). Mientras que para las demás combinaciones solo se observó una tendencia moduladora sinérgica de la actividad luciferasa.

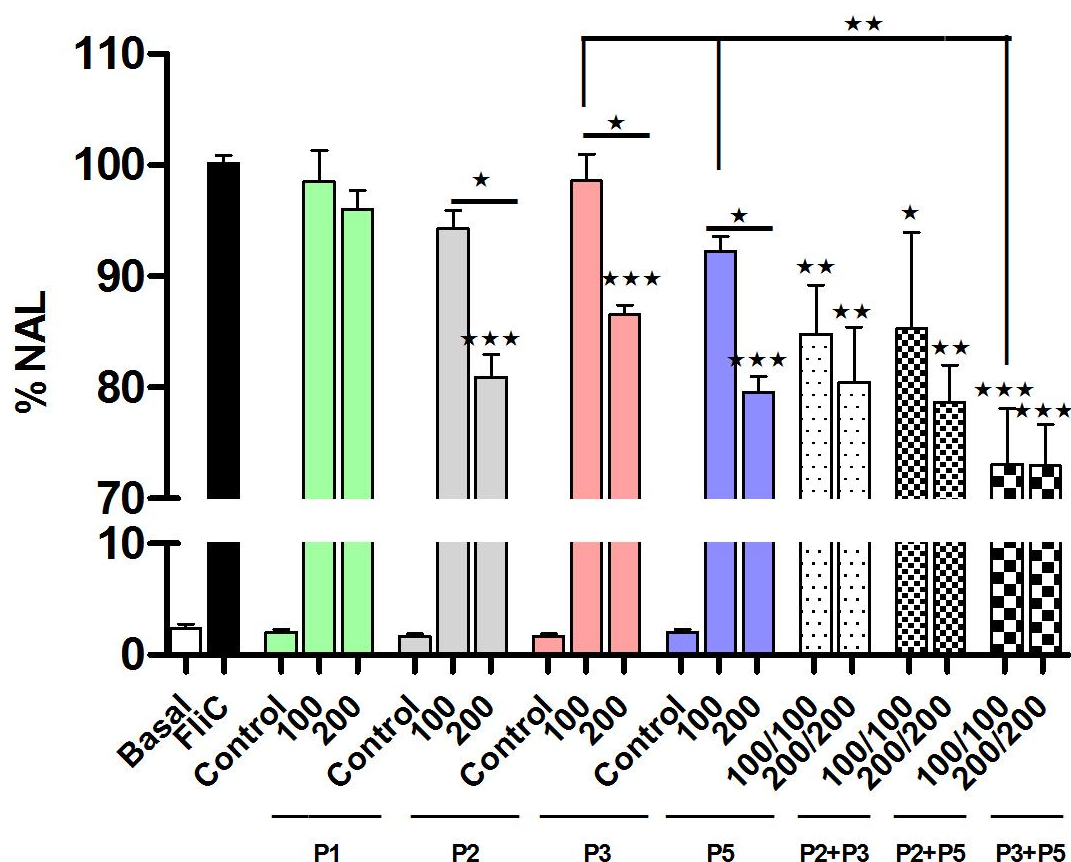


Figura 35. Ensayo de modulación de la actividad luciferasa en Caco-2 ccl20:luc. En la figura se utilizaron los péptidos P1, P2, P3 y P5 a una concentración de 100 µg/mL y 200 µg/mL. Se ensayaron combinaciones de a pares (P2+P3, P2+P5 y P3+P5). Test Anova de una vía, seguido prueba Bonferroni's (\*\*p<0,001, \*p<0,01, \*p<0,05). Los resultados se expresan como la Media ± SD. Estos resultados corresponden a 3 experimentos representativos.

Para descartar que estos resultados sean consecuencia de la toxicidad celular, se realizaron los ensayos de MTT, RN y LDH (Figura 36). Las células Caco-2 ccl20:luc se incubaron con las muestras P2, P3 y P5 a una concentración de 200 µg/mL de proteína, y se obtuvieron valores similares al Control (-), incubado solo con FliC (1,5 µg/mL) en DMEM Adhesión, por lo que no presentaron citotoxicidad.



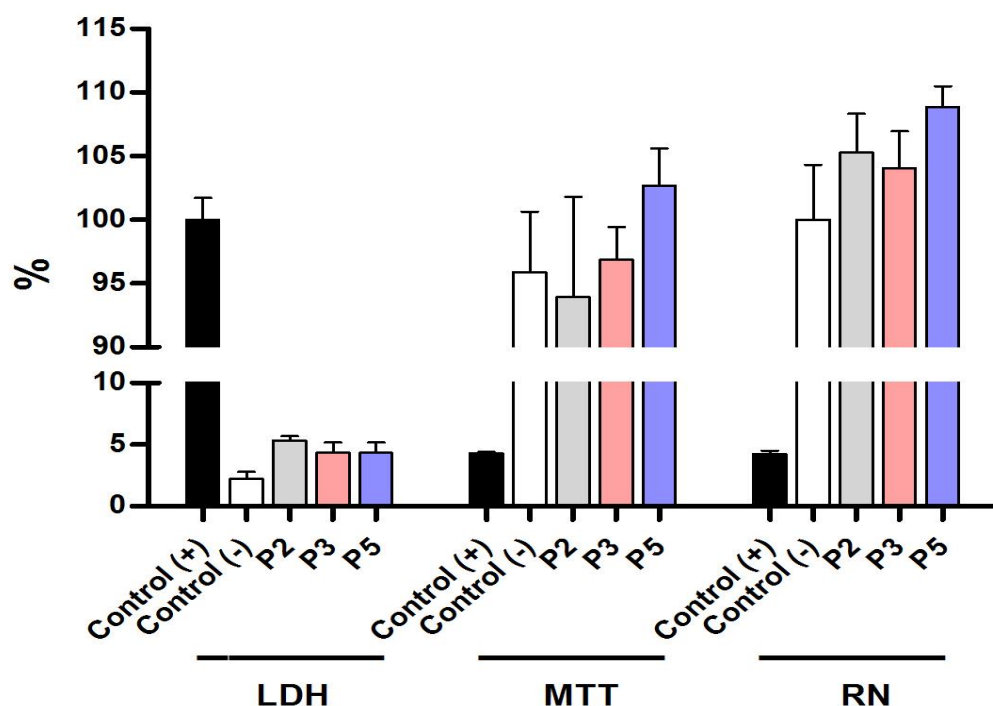


Figura 36. Ensayo de citotoxicidad celular en P2, P3 y P5 por las técnicas de MTT, RN y LDH. Como Control (-), se incubó con FliC en DMEM Adhesión, dando valores cercanos a 100% para MTT y RN, y de 0% para LDH. Como Control (+), se incubó con detergente o etanol en DMEM Adhesión, provocando lisis celular. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

### 3.4.3 Modulación de la expresión de mRNA CCL20 por P2 y P3

Para confirmar los resultados de la inhibición de la actividad luciferasa (Sección 3.4.2), se decidió evaluar el efecto dosis-respuesta a nivel de la expresión relativa de mRNA de la quimioquina CCL20. Para ello se decidió cuantificar el poder supresor de los péptidos P2, P3 y P5 (100  $\mu$ g/mL y 200  $\mu$ g/mL) en un tratamiento simultáneo con el activador FliC en Caco-2. Luego de 2 hs de incubación se cuantificó la expresión relativa de mRNA de CCL20 por qPCR.

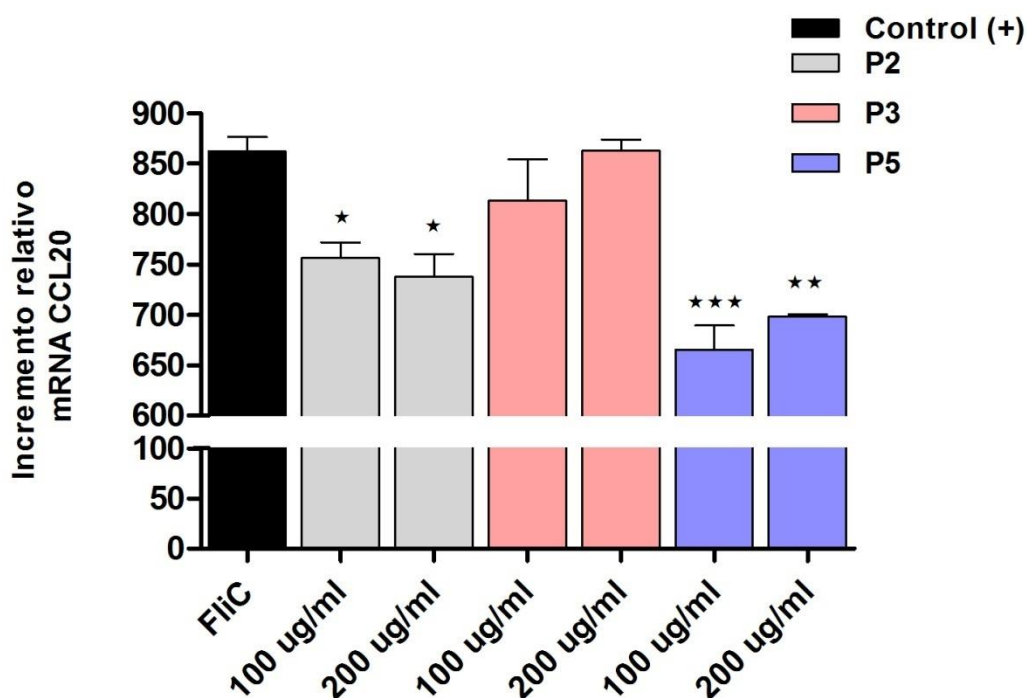


Figura 37. Expresión relativa de mRNA de la quimioquina CCL20 por qPCR en Caco-2. Se muestra la modulación por los péptidos P2, P3 y P5, a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y 200  $\mu\text{g/mL}$  en DMEM frente al estímulo pro-inflamatorio FliC. La cantidad de DNA se normalizó a través del Control interno ( $\beta$ -actina), y el incremento se calculó comparado con el Control (-)(sin activación). Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SD. Test Anova de una vía, seguido prueba Dunnett's (\*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) comparado con el Control (+) FliC. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

En la Figura 37 se muestra la expresión relativa de mRNA de la quimioquina CCL20 pro-inflamatoria en células Caco-2 ccl20:luc activadas y activadas/inhibidas con respecto a las células en reposo. Este ensayo nos permite concluir que el péptido P2 redujo en un 15% la expresión de mRNA CCL20 en las células estimuladas con FliC, con diferencias significativas, llegando a valores cercanos al obtenido por el péptido Control P5 (KPV). Como Control Interno, para normalizar la cantidad de DNA, se midió la expresión de mRNA de  $\beta$ -actina. El incremento de mRNA de las muestras se obtiene por comparación con el Control (-) (solo con DMEM Adhesión).

#### 3.4.4 Modulación de la síntesis CCL20 por P2 y P3

Para confirmar los resultados anteriores, se decidió evaluar el efecto inhibitorio dosis-respuesta en la síntesis de CCL20, por el método de ELISA Indirecto (Sección 9.3). Para

ello, las células Caco-2 se incubaron durante 8 hs con los péptidos P2, P3 y P5, a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y 200  $\mu\text{g/mL}$ ; en un tratamiento simultáneo con FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Luego se midió la quimioquina CCL20 en el sobrenadante de cultivo (Figura 38).

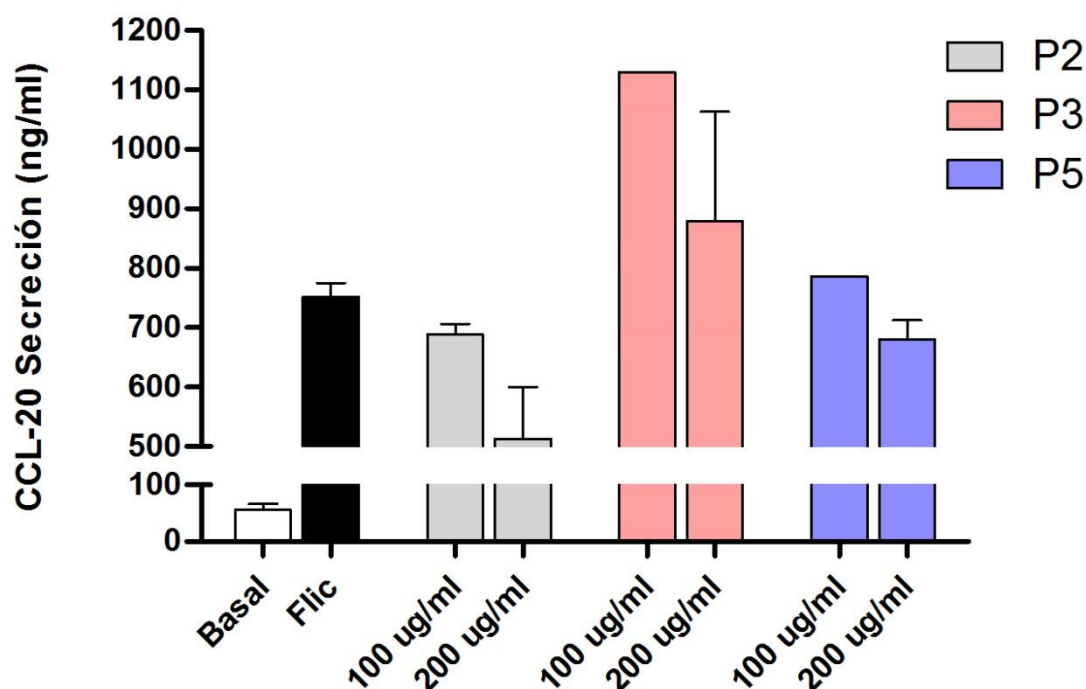


Figura 38. Efecto dosis-respuesta en la síntesis de CCL20 por ELISA indirecto. Las células Caco-2 en estado de confluencia, fueron activadas con FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e incubadas con 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  de los péptido P2, P3 y P5. Se realizó un control (-) con DMEM Adhesión (Basal) y control (+) con FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) en DMEM Adhesión (FliC). Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  SEM. Se realizó el Test Anova de una vía, seguido de la prueba de Dunnett's (\* $p < 0,05$ ), comparado con el Control (+). Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

En la Figura 38 se puede observar nuevamente que P2 ejerce el efecto inhibitorio más significativo (disminución del 30%) seguido por P5 (10%), en la secreción de la proteína CCL20 en el sobrenadante de cultivo, con respecto al Control (+) (activado por FliC), para una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$ . Además, se determinó una tendencia inhibitoria dosis-respuesta, confirmando los resultados obtenidos anteriormente (medida de luciferasa y expresión génica de CCL20).

### 3.5 Transporte transepitelial de oligopéptidos

#### 3.5.1 Evaluación de la resistencia eléctrica transepitelial

Se midió la resistencia eléctrica transepitelial (TER) durante el crecimiento de las células Caco-2 (cada 2-3 días) (M. y M. Sección 8.1) hasta alcanzar valores de TER constantes ( $TER \geq 550 \Omega\text{cm}^2$ ). La incubación celular de Caco-2 en DMEM suplementado se extendió el tiempo suficiente (aproximado de 15-16 días) para lograr que las uniones estrechas intercelulares (tight junctions) se establezcan plenamente (Figura 39).

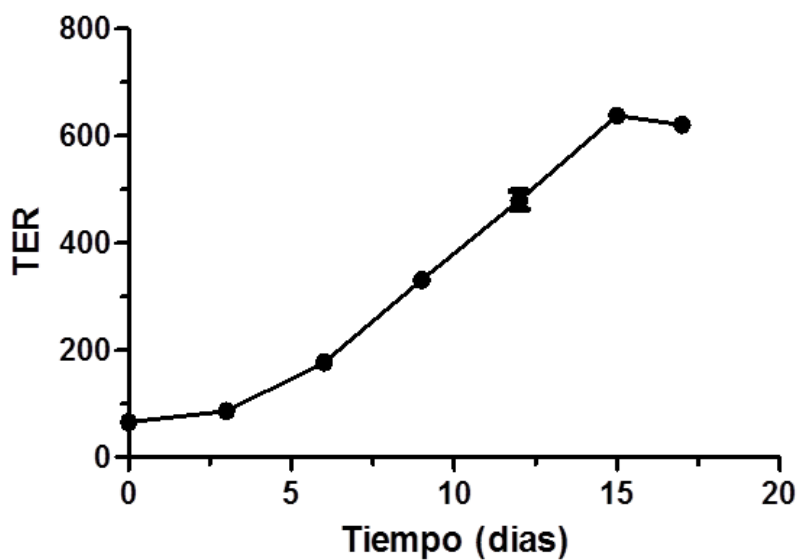


Figura 39. Valores de TER en células Caco-2 en cultivo. Se utilizaron células Caco-2 en placa de 24 fosas. Estos resultados corresponden a 3 experimentos independientes.

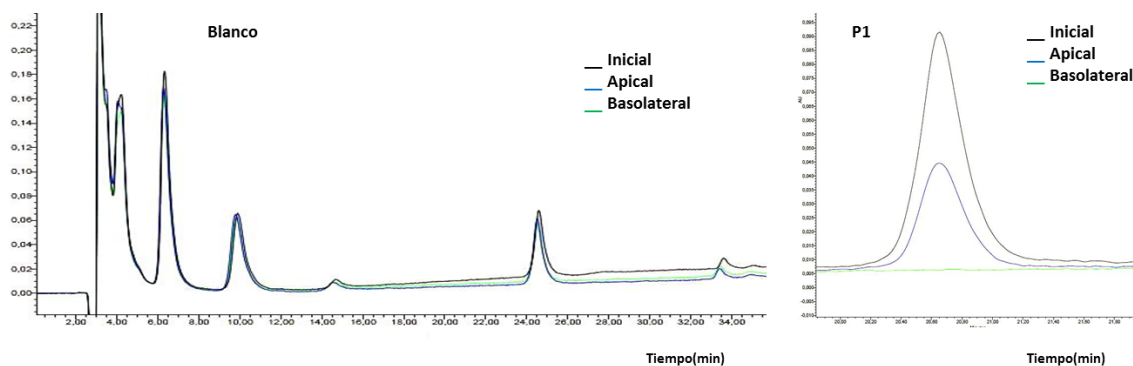
Una vez establecido el tiempo de cultivo necesario para que las células formen una monocapa continua, se realizaron mediciones de TER al inicio y al final del ensayo de incubación con las muestras de los péptidos durante 4 hs (Sección 8.2), con el objetivo de comprobar la integridad de la misma. De esta manera estaríamos en condiciones de afirmar que el pasaje de los péptidos desde la cámara apical a la basolateral no se produce por el debilitamiento de las uniones estrechas intercelulares.

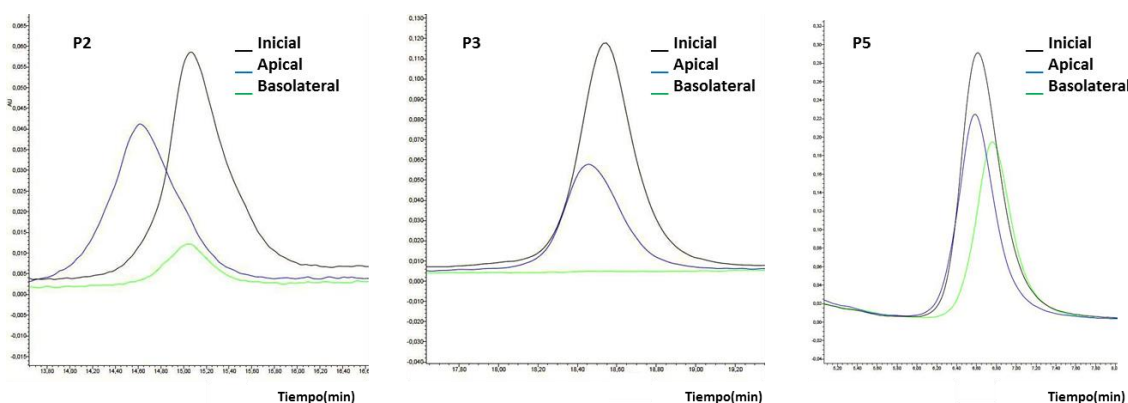
### 3.5.2 Medición del pasaje transepitelial de oligopéptidos

Se analizó e identificó la presencia de péptidos en las muestras Inicial, Apical y Basolateral, mediante cromatografía RP-HPLC haciendo uso de columna analítica (M. y M. Sección 8.3), luego de incubar la monocapa con los péptidos en estudio. Identificados los picos de elución, se procedió a determinar el área de los mismos para evaluar la presencia de P1, P2, P3, P5 y el péptido control Gly-Sar (Figura 40).

El péptido P1 eluye a  $20,65 \pm 0,12$  min, el péptido P2 a  $15,05 \pm 0,09$  min, el péptido P3 a  $18,47 \pm 0,13$  min, el péptido P5 a  $6,61 \pm 0,04$  min y el péptido Gly-Sar a  $3,19 \pm 0,03$  min. La muestra Blanco presenta los picos de los componentes que conforman el medio DMEM Adhesión.

En el intervalo de tiempo de elución de los péptidos P2 y P5 aparecen picos correspondientes a componentes del medio de cultivo (detectables en la muestra Blanco), por lo que sus áreas fueron calculadas por deconvolución a través del programa Peak Fit V4.12. No se pudo realizar el mismo procedimiento para el péptido Gly-Sar debido al error que acarrea su cálculo por la presencia de picos con alta DO.





**Figura 40. Cromatografía por RP-HPLC a  $\lambda=210$  nm, correspondiente a los picos de elución de los péptidos P1, P2, P3 y P5; y el espectro completo de la muestra Blanco. Las muestras P2 y P5 se les realizó deconvolución de sus curvas por PeakFit, debido a la presencia de picos en el mismo intervalo de tiempo de elución, pertenecientes a componentes del medio de cultivo DMEM Adhesión (detectables en la muestra Blanco).**

Se determinó el área de cada péptido en las muestras Apical y Basolateral (Figura 41), luego se comparó con el correspondiente en la muestra Inicial (sin incubación, fijada arbitrariamente en  $100\% \pm \text{SEM}$ , no mostrada en la figura), determinando el porcentaje de retención y de transporte transepitelial (Sección 8.3), respectivamente. Se indicaron las diferencias estadísticamente significativas.

En la Figura 41 podemos observar el porcentaje de retención de los péptidos P1 (~60%), P3 (~60%) y P2 (~70%) en la muestra Apical sin FliC, con diferencias significativas ( $*p<0,05$ ) en P1 y P3 con respecto a la muestra Inicial, indicando una disminución importante en la concentración inicial (200  $\mu\text{g/mL}$ ). Esta disminución podría estar causada por la interacción de los péptidos con transportadores de membrana de oligopéptidos, hidrólisis por peptidasas presentes en el borde en cepillo o unión a receptores de membrana con/sin internalización.

El agregado de FliC (1,5  $\mu\text{g/mL}$ ) no indujo variaciones en los porcentajes de las muestras Apical, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las mismas, indicando que no se tradujo en un aumento en el número de receptores/transportadores de membrana o en una mayor afinidad de los péptidos por los mismos.

Cuando se adicionó Gly-Sar (200  $\mu\text{g/mL}$ ) en la cámara apical, sustrato competitivo para PepT1, se observó una tendencia en el aumento del porcentaje remanente de los péptidos P1, P2 y P3 en las muestras Apical, pero sin que las diferencias sean estadísticamente significativas para las 3 condiciones. Esto estaría indicando una posible competencia por el transportador de membrana. Se deberá utilizar concentraciones

mayores de Gly-Sar para poder afirmar este comportamiento, teniendo como referencia un múltiplo de 10x, utilizada en el trabajo de Kovacs-Nolan y col. (Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012).

En la cámara basolateral (Basolateral) no se detectaron los péptidos P1, P2 y P3, independiente del agregado de FliC o FliC+Gly-Sar. Estos resultados confirman que no se produjo el pasaje del péptido integro hacia la cámara basolateral, posiblemente el transportador de membrana de la cara apical lo internalice y luego las peptidasas intracelulares los conviertan en aminoácidos libres, que serán concentrados en citoplasma y secretados al compartimiento basolateral.

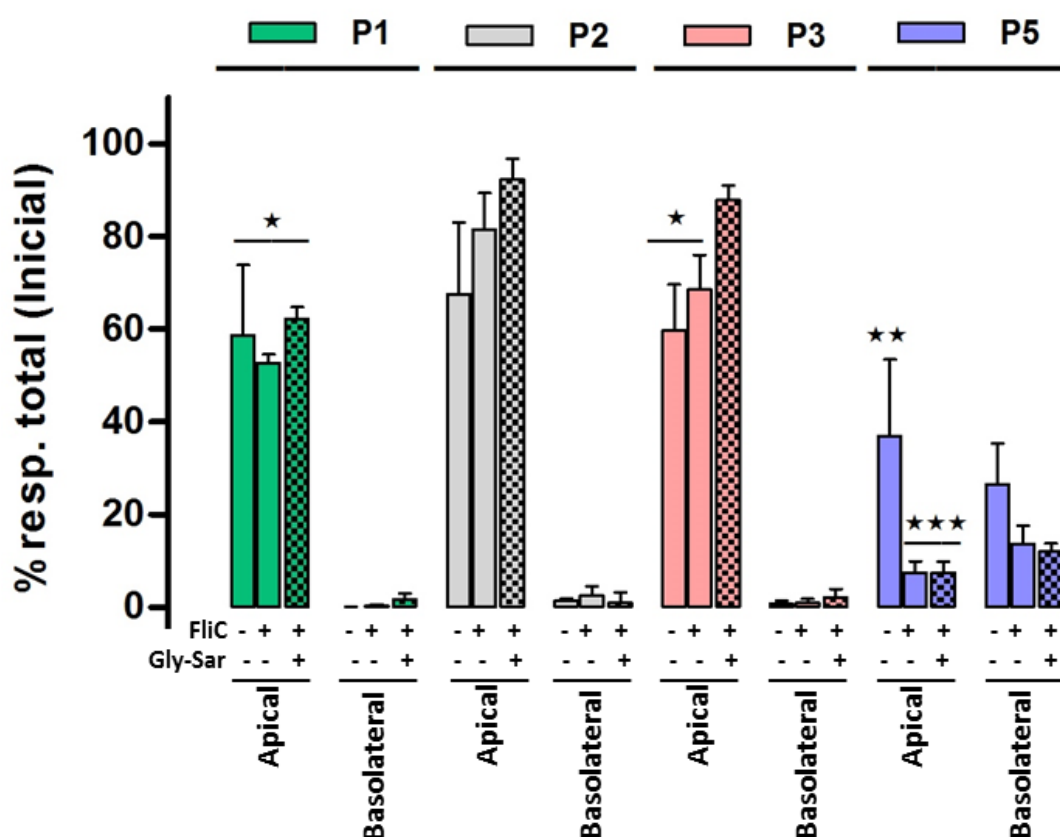


Figura 41. . Transporte peptídico transepitelial en monocapa de células Caco-2. Porcentajes de retención y traspaso de los péptidos P1, P2, P3 y P5, medidos en los compartimentos apical y basolateral, con respecto al Inicial Test Anova de dos vías, seguido de prueba Bonferroni's (\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) comparado con la concentración de la muestra Inicial (sin incubación, no mostrada en la figura). Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SEM. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos, excepto para las muestras con Gly-Sar que corresponden a 1 experimento representativo.

Se observó un elevado transporte transepitelial de P5 (ligando del transportador PepT1) (Dalmaso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008), debido a que solo quedó como remanente en la cámara apical (Apical) un ~30% de la muestra inicial. No se determinó variación por agregado de FliC o FliC+Gly-Sar. La cantidad adicionada del competidor Gly-Sar (200 µg/mL) posiblemente fue insuficiente para impedir la traslocación de KPV. La posible mayor afinidad de KPV por el transportador con respecto a P1, P2 y P3, hace necesaria una mayor concentración para desplazarlo. Además, se observó un ~15% de traspaso celular del péptido P5 a la cámara basolateral (Basolateral), sin variación por el agregado de FliC o FliC+Gly-Sar.

En conclusión, se obtuvo un descenso entre un 30-40% en la concentración de los péptidos P1, P2 y P3 en la cámara apical luego de 4 hs de incubación, sin encontrar evidencia de migración de estos péptidos hacia la cámara basolateral. Se requerirá realizar estudios adicionales empleando péptidos marcados [<sup>3</sup>H] para confirmar el posible tráfico intracelular.



## 4. Conclusión

---

En este Capítulo se detallan los estudios realizados *in vitro* de la actividad inhibitoria de la secreción de la quimioquina CCL20, por acción de AI, AH23, AH30, los Segmentos Hidrofílico, Intermedio e Hidrofóbico obtenidos por HPLC-RP a partir de AH23 y AH30, las fracciones M1-M80 y F1-F15, y por último de los péptidos P1, P2, P3.

Cuando la línea reportera Caco-2 ccl20:luc activada con FliC fue incubada con las muestras provenientes del Amaranto, se logró una disminución en la actividad enzimática luciferasa. Complementariamente se evaluó si el efecto supresor era específico, realizándose ensayos de inhibición dosis-respuesta, incubando las células con distintas cantidades de muestra, obteniéndose resultados positivos, con valores estadísticamente significativos. Además, cuando las células se pre-incubaron con AH30, se obtuvo un descenso de la actividad enzimática luciferasa, manteniéndose el cuadro inhibitorio preventivo al menos por 2 hs. Esto sugiere que los hidrolizados ejercieron un efecto supresor sin necesidad de la presencia de un activador pro-inflamatorio. De esta manera descartamos que FliC induzca la expresión de los receptores/transportadores en la superficie celular, siendo expresados en forma constitutiva por las células epiteliales. Esta característica es de importancia para prevenir procesos inflamatorios descontrolados que alteren finalmente la permeabilidad intestinal y la fisiología del órgano. Para confirmar los resultados, se constató el descenso en los niveles de secreción celular de la quimioquina CCL20 a través de una medida indirecta (activación de la luciferasa intracelular), de la expresión génica y finalmente de la secreción de CCL20 como proteína al sobrenadante de cultivo. Se identificó al péptido P2 como el principal componente del hidrolizado que presenta la mayor capacidad supresora de la activación celular.

En base al estudio del transporte peptídico transepitelial, se determinó la disminución en la concentración de los péptidos P1, P2 y P3 de la cámara apical y su ausencia en la cámara basolateral, indicando la captación celular de los mismos en la cara apical. Por lo tanto el efecto inhibitorio ejercido por los péptidos, podría producirse por la unión a receptores presentes en la membrana celular externa o desde el citosol por internalización dirigida por transportadores de oligopéptidos, por ejemplo PepT1. La co-incubación con FliC no aumentó la captación de los péptidos, por lo que no se tradujo en un aumento en

el número de receptores/transportadores de membrana o en una mayor afinidad por los mismos. Por lo que estamos en condiciones de asegurar que no se requiere de síntesis proteica de *nov*o para que se expresen los receptores/transportadores en la superficie celular, y que los mismos podrían pre-existir en membrana o preformados en el citosol.

Si bien resta aún mucho trabajo por realizar para comprender acabadamente cómo se produce la interacción célula: péptido y los detalles moleculares del mecanismo inhibitorio ejercido sobre la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B y el promotor de CCL20, consideramos que estos resultados son promisorios.

Estamos en condiciones de concluir que las células epiteliales reconocen a los péptidos de *Amaranthus hypochondriacus* y que por algún mecanismo a determinar, ejercen un efecto supresor de la activación celular temprana. Estos resultados nos alentaron a seguir profundizando los estudios sobre los mecanismos anti-inflamatorios en protocolos de modulación, empleando un modelo murino de alergia alimentaria, desarrollado en el Capítulo III.



## ***Capítulo III: MODELO MURINO DE ALERGIA ALIMENTARIA***

---

# 1. Introducción

## 1.1 Hipersensibilidad

Las reacciones de hipersensibilidad son reacciones inmunológicas inapropiadas o excesivas, que se inducen para la eliminación de un determinado antígeno, tras más de una exposición al mismo. Pueden desarrollarse por respuestas humores o celulares, que fisiológicamente se inducen frente a la exposición a microorganismos y tienen en común la instauración de un proceso inflamatorio. En todos los casos participan células, pero se las clasifica según intervengan o no anticuerpos y el tiempo de instauración del proceso inflamatorio posterior a la exposición al antígeno desencadenante.

Los mecanismos de hipersensibilidad inicialmente se clasificaron clínicamente por Gell y Coombs (Gell and Coombs 1963), actualmente se los agrupa en 4 diferentes tipos según el mecanismo inmunológico que los origina y el tiempo que tardan en manifestarse (Tabla 17) (Figura 42):

- Tipo I: Hipersensibilidad inmediata mediada por IgE.
- Tipo II: Hipersensibilidad citotóxica mediada por anticuerpos.
- Tipo III: Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos (Ag-Ac).
- Tipo IV: Hipersensibilidad celular o retardada.

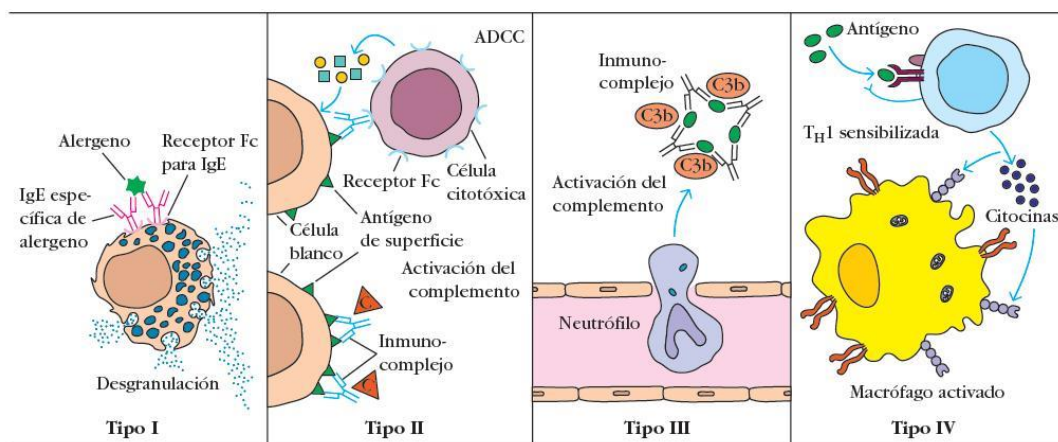


Figura 42. Tipos de Hipersensibilidad. Células y moléculas involucradas (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Tabla 17. Características generales de los mecanismos de Hipersensibilidad.

<b><i>Tipos de Hipersensibilidad</i></b>	<b><i>Tiempo de instauración</i></b>	<b><i>Mecanismo inmunopatológico</i></b>	<b><i>Mecanismo de lesión tisular</i></b>	<b><i>Manifestaciones</i></b>
<b>I. Inmediatas</b>	<b>2-30 min</b>	<b>IgE(LT h2)</b>	<b>Mastocitos, basófilos y sus mediadores</b>	<b>Anafilaxia sistémica y localizada. Alergias alimentarias. Asma. Ronchas y eccemas</b>
<b>II. Mediada por anticuerpos</b>	<b>5-8 h</b>	<b>IgM, IgG contra tejidos</b>	<b>Activación del complemento. Activación de leucocitos</b>	<b>Reacciones transfusionales. Anemias hemolítica autoinmune. Eritroblastosis fetal.</b>
<b>III. Mediada por Inmunocomplejos</b>	<b>2-8 h</b>	<b>Inmunocomplejos Ag-Ac circulantes (IgM, IgG)</b>	<b>Activación del complemento. Activación de leucocitos</b>	<b>Enfermedad del suero. Glomerulonefritis. Artritis reumatoidea. Lupus eritromatoso sistémico</b>
<b>IV. Mediada por células</b>	<b>24-72h</b>	<b>LT CD4+ (LT h1). LT CD8+, neutrófilos, eosinófilos, etc.</b>	<b>Macrófagos activados. Lisis de células diana</b>	<b>Dermatitis de contacto. Tuberculosis. Rechazo de injerto</b>

Es importante señalar que una reacción de hipersensibilidad puede ser causada por cualquiera de estos 4 mecanismos inmunopatológicos y que es común que más de uno se encuentre involucrado. Por ejemplo, en el asma pueden existir anticuerpos IgE (Tipo I) y neutrófilos (Tipo IV) que actúen sinérgicamente o secuencialmente para inducir la remodelación tisular, que trae aparejado el daño tisular y a la insuficiencia respiratoria. Se considera que la Hipersensibilidad de Tipo I es la más importante por los riesgos que conlleva para el paciente, dado que la activación sistémica de basófilos sensibilizados con anticuerpos IgE, proceso denominado *anafilaxia* (Cap. Sección 1.4), puede poner en peligro la vida del individuo. Por esta razón los esfuerzos están centrados en caracterizar los mecanismos inmunológicos mediados por IgE.

## 1.2 Alergia alimentaria

Cuando el antígeno (Ag) es una proteína extraña, inocua, ampliamente distribuida en el ambiente, aparentemente no relacionada con antígenos microbianos, el Ag se denomina **alergeno** y la respuesta inmune se denomina **alergia**. Si se trata de un Ag presente en un tejido propio, la respuesta se denomina autoinmunidad.

Dichos alergenosen se pueden clasificar según la vía de entrada en el organismo, pudiendo ser inhalantes, alimentarios e inyectables. Los alergenosen alimentarios, que actúan por vía digestiva, son componentes inmunogénicos y antigénicos presentes básicamente en alimentos que ingresan por vía digestiva (leche, soja, trigo, maní, huevo, etc.). En nuestro modelo murino emplearemos las proteínas de la leche de vaca (PLV) como alergeno alimentario. La **alergia alimentaria** se define como manifestaciones clínicas producidas por una alteración en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos de la dieta, encuadrándose en reacciones de Hipersensibilidad Tipo I (Inmediatas) (Beyer, Castro et al. 2002), (Vandezande, Wallaert et al. 1999).

La Hipersensibilidad Tipo I es una patología que presenta una predisposición poligenética, pero que además necesita de una serie de factores ambientales como disparadores para que se manifieste. Se ha postulado la “**Hipótesis de la higiene**”(Strachan 1989), que trata de explicar porque ocurre esta tendencia en la actualidad. Esta hipótesis hace referencia a que en la vida moderna, los hábitos de vida son cada vez más pulcros, una menor exposición a los microorganismos intracelulares dado por una mejora en los planes de vacunación, una mayor eficacia de la acción de los antibióticos, un menor contacto con la naturaleza, etc.. Esto conlleva a una menor exposición a los ligandos que poseen motivos moleculares presentes en los microorganismos (patrones moleculares relacionados con patógenos, PAMPs), que se unen a los receptores tipo Toll (TLRs). Estos receptores son capaces de detectar una amplia variedad de virus, bacterias, hongos e incluso algunos protozoarios simples en las células presentadoras de antígeno (CPA), por lo que conducen a una menor activación de los mecanismos Th1-dependientes. Por otro lado, existe una mayor exposición a los alergenosen alimentarios y ambientales, debido a hábitos de vida más intra-domiciliarios, circunscriptos a lugares encerrados con calefacción o refrigeración central, prevalencia de alfombra en ámbitos laborales, etc.; factores que determinan una predisposición a los mecanismos Th2-dependientes.

Por lo tanto, una menor exposición a los ligandos activadores de los mecanismos Th1-dependientes junto a una mayor exposición a los alérgenos en individuos susceptibles, condicionan la homeostasis inmunológica, instaurando los mecanismos Th2-dependientes en contraposición a los Th1-dependientes, impulsando el desarrollo de la alergia (Shirakawa, Enomoto et al. 1997).

Sin embargo, la “Hipótesis de la higiene” actualmente resulta controversial, dado que no sólo la incidencia de las patologías Th2-dependientes (enfermedades alérgicas) se ha incrementado en las últimas décadas, sino también las Th1-dependientes (Diabetes mellitus Tipo I, enfermedad de Crohn, etc.) (Okada, Kuhn et al. 2010). En muchas de estas patologías, incluyendo las alergias, se ha demostrado fallas en la regulación de mecanismos inmunológicos, principalmente por deficiencias a nivel de los mecanismos de tolerancia (linfocitos T regulatorios -LTreg), por lo cual cualquier subpoblación que se encuentre regulada homeostáticamente por los LTreg puede estar aumentada y generar una patología (McGuirk, Higgins et al. 2010).

Podemos mencionar algunos factores adicionales que influyen en la activación de los mecanismos inmunológicos de la alergia alimentaria, como son la concentración del alérgeno, la duración y frecuencia de la exposición, la edad del individuo susceptible y la avidez de las interacciones alérgeno-específicas de los LT con las células presentadoras de antígeno (CPA).

### 1.3 Generalidades de los mecanismos de Hipersensibilidad Tipo I

La Hipersensibilidad Tipo I, como las demás reacciones de hipersensibilidad, requiere para instaurarse de sucesivos contactos con el *alérgeno*. Las reacciones de hipersensibilidad inmediata constan de dos fases consecutivas: la fase inicial de sensibilización y la subsiguiente fase efectora (Figura 43).



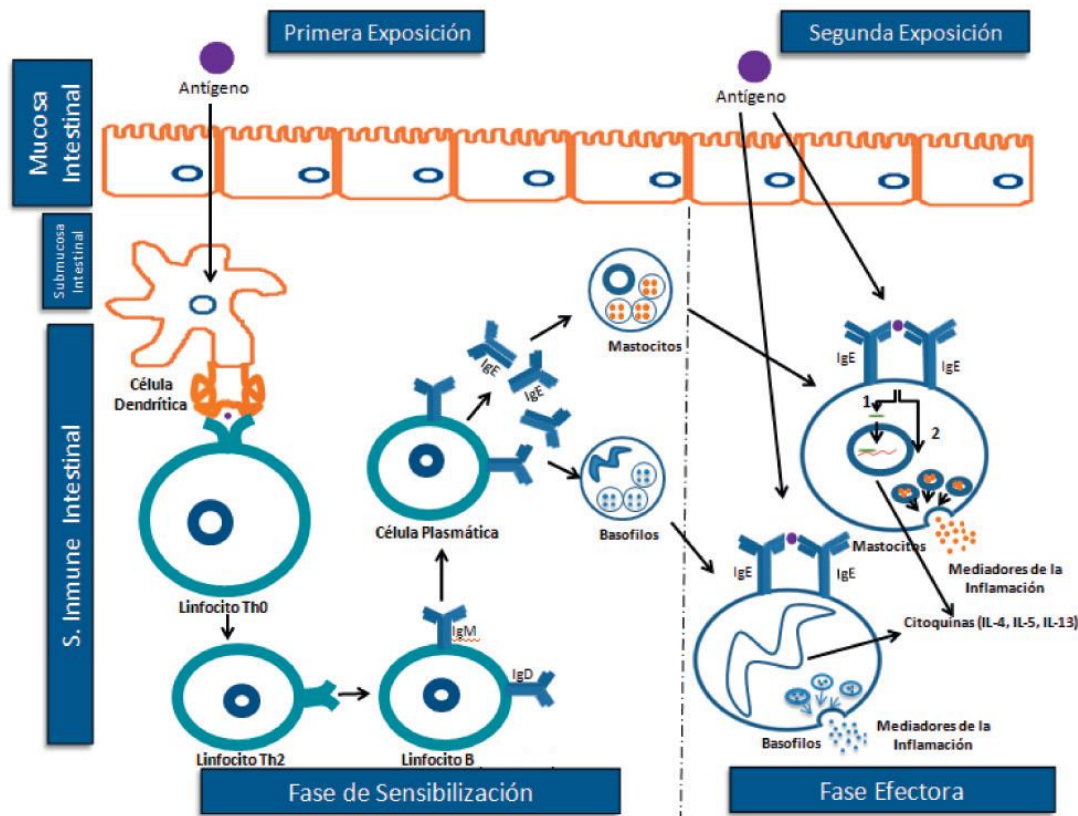


Figura 43. Mecanismos de Hipersensibilidad Tipo I. (Urrego Álvarez, Hernández Bonfante et al. 2009)

La **fase de sensibilización** se produce frente a la primera exposición al alérgeno. Brevemente, ésta consiste en la sobreproducción y secreción de IgE por parte de las células plasmáticas, luego que el linfocito B (LB) interactúa con los linfocitos T colaboradores CD4<sup>+</sup> de fenotipo Th2 (LTh2). Estos producen la interleuquina 4 (IL-4), esencial para promover la diferenciación de los LB a células plasmáticas productoras de IgG1 e IgE. Mientras que la IL-3, IL-5, IL-13 y el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) favorecen la producción y la supervivencia de basófilos, mastocitos y eosinófilos. Los basófilos se encuentran en circulación mientras que los mastocitos y los eosinófilos en los tejidos. Todas estas células, a través de sus receptores de alta afinidad de membrana (FcεR1) se unen a la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos IgE en forma prácticamente irreversible y sin la necesidad de estar unida al alérgeno (Morafo, Srivastava et al. 2003). Aunque la vida media de la IgE en el suero es apenas de 20-30 días, una vez que se fija a su receptor en la membrana celular, puede durar hasta 3 meses. Por lo tanto, los anticuerpos IgE se encuentran fundamentalmente en la superficie de estas células, y su concentración sérica

es muy reducida (ng/mL). De esta manera, las células sensibilizadas se generan durante las primeras exposiciones al alérgeno.

La **fase efectora** se obtiene cuando las células sensibilizadas contactan al alérgeno y se produce su activación. La liberación del contenido de los gránulos genera un foco inflamatorio inmediato (en minutos) en el tejido donde se activa la célula, o en circulación si se trata de los basófilos. Pero al mismo tiempo, la activación celular dependiente de IgE inicia una serie de procesos intracelulares producto de los cuales se sintetizan otros mediadores inflamatorios (leucotrienos, prostaglandinas, citoquinas quimioquinas, etc.), cuya función al secretarse será la de mantener el foco inflamatorio en el tiempo (horas y días).

La fase efectora de activación celular que genera el proceso inflamatorio consta de 2 etapas: una inmediata o temprana (proceso inflamatorio agudo) y una tardía. Para que se produzca la activación celular y la **fase temprana**, los anticuerpos IgE anclados a la membrana celular deben ser puenteados por el alérgeno, es decir que éste debe tener al menos dos epítopes capaces de interactuar con dos moléculas diferentes de IgE. El entrecruzamiento de las moléculas de IgE y los receptores FcεR1 induce un complejo proceso intracelular que finalmente culmina con la desgranulación y liberación del contenido de sus gránulos citosólicos en forma inmediata. Pero además este proceso dispara la síntesis *de novo* de otros mediadores pro-inflamatorios a partir de fosfolípidos presentes en la membrana plasmática (prostaglandinas y leucotrienos) y la activación génica (citoquinas y quimioquinas), dando lugar a la **fase tardía**.

Podemos mencionar algunos mediadores que intervienen en las fases temprana y tardía, correspondientes a la Hipersensibilidad Tipo I (inmediata) secretados por mastocitos y basófilos (Tabla 18):

**Mediadores preformados** se producen en la célula en reposo y se almacenan en los gránulos citoplasmáticos. El más importante en humanos es la histamina, encargada de provocar vasodilatación, broncoconstricción y aumento en la permeabilidad capilar; también contienen heparina (anticoagulante) y factores quimiotácticos de eosinófilos y neutrófilos (quimioquinas).

**Mediadores de “síntesis *de novo*”:** se sintetizan una vez que la célula se activa y son liberados al medio extracelular. Podemos mencionar a leucotrienos (responsables de la broncoconstricción, vasodilatación, edema de mucosas, secreción de moco), las

prostaglandinas (broncoconstricción), citoquinas, quimioquinas y factores de agregación plaquetaria (PAF).

**Tabla 18. Principales mediadores en la Hipersensibilidad Tipo I**

Mediadores	Efectos
<b>Tempranos</b>	
Histamina, heparina, Serotonina (roedores)	Aumento de la permeabilidad vascular; contracción del músculo liso
Factor quimiotáctico de eosinófilos (ECF-A)	Quimiotaxis de eosinófilos
Factor quimiotáctico de neutrófilos (NCF-A)	Quimiotaxis de neutrófilos
Proteasas (triptasa, quimasa)	Secreción bronquial de moco; degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos; generación de productos del desdoblamiento del complemento
<b>Tardíos</b>	
Factor activador de plaquetas	Agregación y activación plaquetaria; contracción de los músculos lisos
Leucotrienos (sustancia de reacción lenta de la anafilaxis, SRS-A)	Aumento de la permeabilidad vascular; contracción de los músculos lisos
Prostaglandinas	Vasodilatación; contracción de los músculos lisos pulmonares; agregación plaquetaria
Bradicinina	Aumento de la permeabilidad vascular; contracción del músculo liso
IL-1 y TNF- $\alpha$	Inflamación sistémica
IL-4, IL-13	Secretadas por LTh2 y mastocitos. Promueve la diferenciación de TH2; cambio de isotipo a IgE
IL-5, IL-9	Secretada por LTh2. Activación y generación de eosinófilos
IL-6	Inflamación. Secretada por células endoteliales.
IL-3	Secretadas por LTh2 activados, mastocitos y eosinófilos. Estimula la formación de colonias de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos
IL-10, TGF- $\beta$ , INF- $\gamma$	Disminuyen la síntesis de IgE

El proceso inflamatorio alérgico inducido por la secreción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4, etc.) y quimioquinas (factor quimiotáctico de eosinófilos o ECF-A, IL-8, MIP-1, RANTES, eotaxina, etc.) se caracteriza por un infiltrado celular en el órgano blanco, que dependiendo del tipo de mecanismo involucrado serán las células presentes (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos, mastocitos, etc.) (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Las reacciones de fase temprana y tardía inducidas por **mastocitos** tisulares generan una inflamación localizada luego de la exposición al alérgeno. Cuando este proceso se induce en forma reiterada, la inflamación puede llegar a dañar el tejido en forma irreversible (remodelamiento tisular en el asma).

Si el proceso inflamatorio se induce por la exposición de los **basófilos** circulantes al alérgeno, el proceso se denomina anafilaxia y la inflamación es sistémica, pudiendo poner en riesgo la vida del paciente por afectación de los órganos vitales (corazón, pulmón, etc.).

Los **eosinófilos** desempeñan una función muy importante en la reacción de fase tardía y constituyen cerca de 30% de las células acumuladas, por ejemplo, son responsables de la inflamación crónica de la mucosa bronquial que caracteriza al asma persistente. A diferencia de los mastocitos y basófilos en su gránulos se encuentran, además de histamina y heparina, sustancias con un potente efecto tóxico (proteína catiónica del eosinófilo, proteína básica de membrana, neurotóxica del eosinófilo, etc.) sobre las células circundantes.

Hay que considerar que los mecanismos IgE-dependientes han surgido en la escala evolutiva como un mecanismo de defensa frente a macro-parásitos, por lo cual la acción combinada de mastocitos, basófilos y eosinófilos tiene como finalidad instaurar un foco inflamatorio que dañe la cubierta del parásito y elimine al mismo.

Los **neutrófilos** se encuentran frecuentemente en los infiltrados alérgicos, y constituyen el 30% de las células inflamatorias. La **IL-8** liberada por los mastocitos al degranularse atrae a estas células. Cuando los neutrófilos circulantes migran al tejido donde se indujo el foco inflamatorio se activan y liberan el contenido de sus gránulos, entre los que se encuentran enzimas líticas, factor activador de plaquetas, citoquinas y leucotrienos. Por lo tanto la migración y activación de neutrófilos perpetúa el foco inflamatorio y cuando éste se induce en forma repetitiva las sustancias liberadas terminan dañando el tejido circundante.

## 1.4 Manifestaciones clínicas de la alergia alimentaria

Dada la importancia clínica de las reacciones de Hipersensibilidad Tipo I, se las denomina **reacciones atópicas**. Es decir que las alergias mediadas por anticuerpos IgE se denominan **alergias atópicas**, y el individuo susceptible a este tipo de patología se lo denomina **atópico**.

El término **atopía** (deriva de la palabra griega que significa “extraño”) se utiliza para describir enfermedades mediadas por IgE en respuesta a la exposición reiterada de alérgenos. Los pacientes atópicos poseen una alta predisposición genética a producir anticuerpos IgE contra alérgenos ambientales, manifestándose en enfermedades atópicas como la rinitis alérgica, el asma, las alergias alimentarias, el eccema atópico, etc. (Kay 2001) (Tabla 19).

Los **individuos no atópicos**, cuando se los expone a un determinado antígeno inocuo, desarrollan los mecanismos de tolerancia, produciéndose anticuerpos alérgeno-específicos IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>4</sub> que no desencadenan reacciones inflamatorias, a diferencia del isotipo IgE. Por el contrario, los **individuos atópicos**, montan una respuesta exacerbada frente al alérgeno, determinando una reacción de Hipersensibilidad Tipo I, caracterizada por la producción de anticuerpos alérgeno-específicos IgE. Estos anticuerpos se encuentran elevados en circulación, pero principalmente están unidos a sus receptores de alta afinidad FcεR1 en mastocitos, basófilos y eosinófilos, induciendo su activación y provocando un foco inflamatorio.

Por lo tanto en un individuo atópico es posible detectar:

- **IgE específica en suero:** Se mide por inmunoensayo EAST.
- **Mastocitos sensibilizados en la piel:** Se evidencian través de pruebas cutáneas.
- **LTh2 en circulación:** Estas células se evidencian *in vitro* al expandirlas con el alérgeno específico PLV y por análisis de secreción de las citoquinas: IL-4, IL-5 e IL-13.
- **LTh1 en circulación:** Estas células se evidencian *in vitro* al expandirlas con el alérgeno específico PLV y por análisis de secreción de INF-γ.
- **Características inmunopatológicas:** Es posible observar infiltrado celular con eosinófilos, mastocitos y LT, en el tejido inflamado (Romagnani 1991).
- **Niveles aumentados de quimioquinas provenientes de la activación de la inmunidad innata:** RANTES, eotaxina, CCL20, MIP-1α, MDC, etc. (Kay 2001).

Las manifestaciones clínicas más comunes, desencadenadas por la alergia alimentaria se pueden resumir en la Tabla 19:

**Tabla 19. Manifestaciones clínicas por alergia alimentaria atópica.**

Enfermedad	Manifestación clínica	Inmunopatología adicional	Desencadenantes alimentarios
Urticaria/Angioedema.	Ronchas, eritemas y edemas. Iniciado por ingestión o por contacto directo con la piel. La ingestión es comúnmente causa aguda (20%) pero rara vez crónica (2%) de urticaria.		Varios alimentos.
Síndrome de alergia oral (relacionada al polen).	Prurito, edema leve limitado a la cavidad oral.	Sensibilización a las proteínas del polen por las vías respiratorias resulta en la producción de IgE, que se une a ciertas proteínas alimentarias homólogas, típicamente lábiles.	Frutas frescas y verduras.
Rinitis alérgica (fiebre del heno)	Exudación acuosa de las conjuntivas, la mucosa nasal y las vías respiratorias superiores, así como estornudos y tos.		Pueden ser provocados por la inhalación de alimentos en forma de aerosoles formados por proteínas alimentarias (ej. Leche hervida, harina de maní) o por ingestión.
Asma	El edema de vías respiratorias, la secreción de moco y la inflamación contribuyen a la constricción bronquial y la obstrucción de las vías respiratorias bajas.		

<b>Anafilaxia</b>	<b>Progresar rápidamente, afecta múltiples órganos, puede inclusive provocar colapso cardiovascular.</b>	<b>Liberación masiva de mediadores.</b>	<b>Maní, nueces, pescado, mariscos, semillas, y la leche entre otros.</b>
<b>Anafilaxia asociada a los alimentos, inducida por ejercicio.</b>	<b>Anafilaxia desencadenada por alimentos, sólo si luego de la ingestión temporal se realiza ejercicio.</b>	<b>Se cree que el ejercicio altera la absorción intestinal y/o la digestión del alérgeno.</b>	<b>Los más comúnmente descritos son trigo, apio y mariscos.</b>
<b>Dermatitis atópica (eccema alérgico)</b>	<b>Asociada a los alimentos, en el 35% de los niños con erupción moderada a severa, en general durante la lactancia.</b>	<b>Relacionada al homing en piel de LTh2 y un número incrementado de eosinófilos.</b>	<b>Huevo, leche, trigo, soja, entre otros.</b>

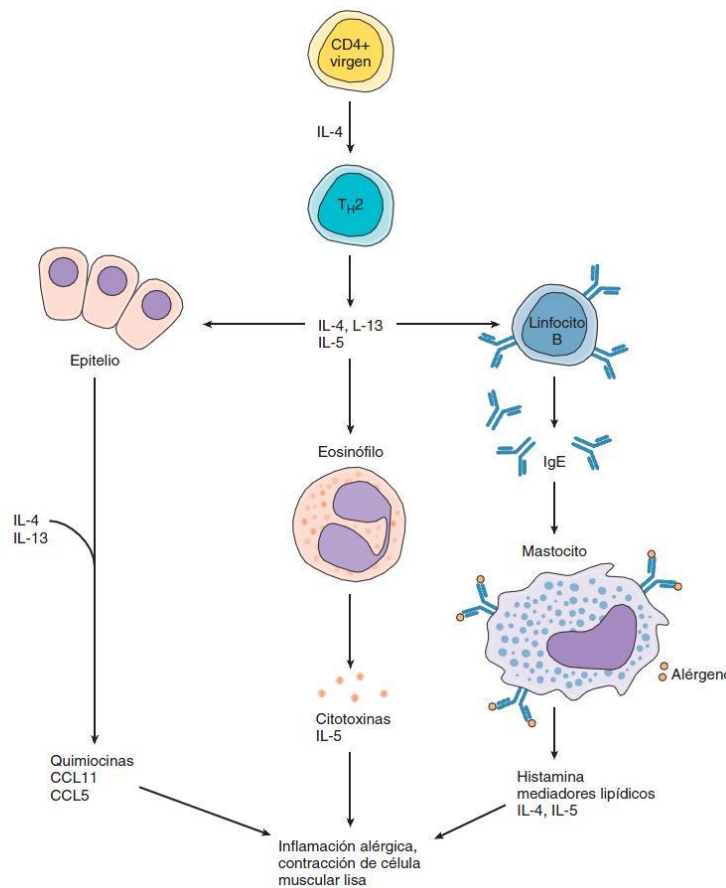
Por lo tanto, la activación sostenida y reiterada de mastocitos, basófilos y eosinófilos mediada por los anticuerpos IgE luego de la exposición al alérgeno, genera un foco inflamatorio responsable de los signos clínicos. Cuando este proceso se induce en la **piel** podemos tener una dermatitis, urticaria, eccema, etc.; cuando se produce en la **mucosa gastrointestinal** podemos observar diarrea, vómitos, dolor abdominal, etc.; cuando se produce en el **árbol respiratorio** se puede observar rinitis, broncoconstricción, asma, etc.; y si se produce en **circulación** afectando a más de 3 órganos estamos ante una anafilaxia.

Es decir que la alergia no es una enfermedad única sino que se trata de un **síndrome**, que puede tener múltiples manifestaciones clínicas dependiendo del mecanismo que lo induzca y el o los órganos blancos afectados.

### 1.5 Factores inmunológicos que regulan los mecanismos mediados por LTh1 y LTh2

Los LTh1 y LTh2 se diferencian funcionalmente a partir de las citoquinas que secretan y los mecanismos efectores que inducen. Mientras los LTh1 promueven los mecanismos celulares básicamente encargados del control de microorganismos intracelulares, los

LTh2 se encargan de montar las respuestas frente a los microorganismos extracelulares. Pero además, se ha determinado que estas poblaciones celulares participan en procesos patológicos tales como las enfermedades autoinmunes (LTh1) y las alergias IgE-mediadas (LTh2). Sin embargo, dada la complejidad de las alergias, en general ambos tipos celulares pueden participar en la inmunopatogenia. Esto se ha demostrado tanto en humanos como en modelos animales (ratones), ya sean procesos infecciosos o inmunopatológicos.



**Figura 44. Mediadores implicados en la reacción de Hipersensibilidad Tipo I.** La IL-4 es un factor clave en la patogenia. La IL-4 favorece el desarrollo del LTh2. La IL-4 y la IL-13 inducen el cambio de isotipo del LB y la producción de IgE, e inducen la expresión de quimiocinas por parte las células epiteliales y otros tipos de células. La IL-5 promueve la producción de eosinófilos y la secreción de citoquinas. Las citoquinas de los LTh2 también influyen directamente en las células musculares lisas (Li-Weber and Krammer 2003).

En una alergia mediada por IgE, las citoquinas secretadas por las células **LTh2**, como IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, etc., estimulan las reacciones de fase temprana y tardía (Figura 44). **IL-4 e IL-13** intensifican el cambio de isotipo a IgE y estimulan su secreción; **IL-4 e IL-9**



promueven el desarrollo de mastocitos, en tanto que **IL-5 e IL-9** intensifican la maduración, activación y acumulación de eosinófilos. Además, las IL-4, IL-9 e IL-13 promueven la sobreproducción de moco (Kay, 2001) (Tabla 20). Además, la **IL-4** promueve la producción de IgG1 e IgE y suprime la de IgG2a.

En contraste, los **LTh1** producen **IFN- $\gamma$** , que promueve a los LB el cambio de isotipo de anticuerpo a clases de IgG (como IgG2a en el ratón) que intervienen en la fagocitosis y en la fijación de complemento, además inhibe la producción de IgG1 e IgE. Adecuado para responder a infecciones víricas y a patógenos intracelulares.

De este modo, en base a las respuestas de LTh1 y LTh2 obtenemos como resultado diferentes perfiles de anticuerpos. Además, estas poblaciones linfocitarias son contra-regulatorias entre sí. El **IFN- $\gamma$**  secretado por las células LTh1 inhibe la diferenciación de LT a LTh2, mientras que la **IL-4** secretada por LTh2 inhibe la diferenciación de los LTh1. Por lo tanto el balance de las citoquinas en el entorno de activación de los LT determinará el fenotipo al que se diferenciarán.

**Tabla 20. LTh1 y LTh2 de ratón, principales funciones y secreción de citoquinas.**

Secreción de Citoquinas	LTh1	LTh2
IL-2	+	-
INF- $\gamma$	++	
TNF- $\beta$	++	-
GM-CSF	++	-
IL-3	++	+
IL-4	-	++
IL-5	-	++
IL-10	-	++
IL-13	-	++
Funciones	LTh1	LTh2
Producción total de anticuerpos	+	++
IgE	-	++
IgG1	-	++
IgG2a	++	-

<b>Eosinófilos y mastocitos</b>	-	++
<b>Macrófagos</b>	++	-
<b>Hipersensibilidad inmediata (tipo I)</b>	-	++
<b>Hipersensibilidad tardía (tipo IV)</b>	++	-
<b>Activación de LTc</b>	++	-

La reacción frente a un alérgeno en **individuos atópicos** incluye la inducción de LTh2 con la consiguiente hiper-producción de IgE; mientras que **en individuos no atópicos** se inducen los mecanismos de tolerancia que incluye la generación de LTh1 y la secreción de IgG o IgA, con niveles basales de IgE. Por lo tanto, el balance de las poblaciones celulares de LTh1 y LTh2 son las que determinan la instauración y regulación de las reacciones de Hipersensibilidad Tipo I.

## 1.6 Toxina colérica y proteínas de leche de vaca

Las **proteínas de leche de vaca (PLV)** se comportan como inmunógenos muy pobres cuando son administrados por vía intragástrica, ya que no poseen la capacidad de inducir la inmunidad innata al no contener PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) ni MAMPs (patrones moleculares asociados a microorganismos), por tratarse de proteínas eucarióticas.

Si se administra PLV por vía oral en **ratones naïve o en individuos no alérgicos (no atópicos)**, el proceso fisiológico que se induce es la *tolerancia oral* (Cap. III Sección 1.8). Brevemente, consiste en un complejo y aún no completamente dilucidado conjunto de mecanismos celulares y moleculares que evitan la instauración de mecanismos de hipersensibilidad para preservar la integridad de los mismos y de esta manera poder absorberlos como nutrientes en la mucosa intestinal.

En **individuos alérgicos (atópicos)** en lugar de inducirse los mecanismos de tolerancia, se inducen mecanismos Th2-dependientes responsables de generar la secreción exacerbada de anticuerpos IgE específicos. El **modelo murino de alergia alimentaria** desarrollado en el Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (UNLP - CONICET - IIFP) pretende reproducir el cuadro clínico de esta enfermedad, que cursa en seres humanos. Para ello se administraron proteínas de leche de vaca (PLV) por vía

intragástrica junto a un adyuvante mucosal pro-Th2 (toxina colérica -TC), que induce la hiper-secreción de IgE y un proceso inflamatorio local y sistémico; “rompiendo” con la tolerancia natural y obteniendo un cuadro similar al que ocurre en pacientes con alergia alimentaria (Smaldini, Curciarello et al. 2012, Smaldini, Ibañez et al. 2014).

La **toxina colérica (TC)** es producida por la bacteria *Vibrio cholerae*, ejerciendo su actividad adyuvante por unión a gangliósidos GM1 en células de la inmunidad innata de intestino (células epiteliales, células dendríticas, macrófagos, etc.) (Holmgren, Lönnroth et al. 1975, Magnani, Smith et al. 1980). Induciendo una respuesta proinflamatoria *in vivo* por interacción con la vía NF-κB (Mempel, Henrickson et al. 2004) (Lycke 2005). Es capaz de estimular la maduración de las **células dendríticas** (CD) y de los **macrófagos**, induciendo la expresión en la superficie de las células de moléculas de MHC clase II y moléculas co-estimuladoras, necesarias para la activación a **LTh2** (Gagliardi and De Magistris 2003). Además es capaz de activar a los **enterocitos** con la consiguientes secreción de la quimioquina CCL20 (Anjuere, Luci et al. 2004) que induce un aumento en la migración de las CD inmaduras a la mucosa intestinal, que luego de captar al antígeno migran a los ganglios linfáticos mesentéricos e interactúan con los LT para inducir los LTh2 (sitio inductivo). Asimismo estimulan a los **LB**, los que por colaboración con los LTh2 se transforman en células plasmáticas secretoras de IgE. Estas células emigran del ganglio, pasan a circulación y se dirigen nuevamente a la mucosa intestinal (sitio efector) donde terminan de activarse y secretar anticuerpos IgE (*homing diferencial*) (Cap. III, Sección 1.7).

## 1.7 Sistema inmune de la mucosa intestinal

El sistema inmune intestinal constituye la parte más compleja y extensa del sistema inmune. Recibe diariamente gran cantidad de carga antigénica, pudiendo distinguir entre los patógenos invasivos y los antígenos inocuos procedentes de los alimentos y de las bacterias comensales.

El intestino posee mecanismos que limitan el acceso de sustancias nocivas al organismo mediante una barrera física dada por el epitelio intestinal y las bacterias que constituyen la flora microbiana, además de las enzimas digestivas pancreáticas. Siendo la barrera más efectiva, la constituida por el tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal (**GALT**) (Gut-Associated Lymphoid Tissue).

Anatómicamente el GALT se divide en dos compartimentos (Figura 45):

**Estructurado:** sitio inductor de la respuesta inmunitaria intestinal, constituido por folículos linfoides aislados, placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos.

**Difuso:** sitio efector de la respuesta inmunitaria, integrado por linfocitos dispersos en el compartimento epitelial (intraepithelial lymphocytes -IEL) y en la lámina propia intestinal (lamina propria lymphocytes -LPL)(Newberry and Lorenz 2005). Este tejido linfoide se encuentra separado del lumen intestinal por una monocapa de células (follicle-associated epithelium -FAE), formada por enterocitos, células M, IEL y algunas células secretoras de mucus (gobletcells).

Las **células M** son enterocitos especializados en la captación de antígenos del lumen intestinal, en su superficie luminal presentan pliegues en lugar de los microvellosidades y carecen de recubrimiento de glicocálix (Neutra, Frey et al. 1996).

Las **áreas interfoliculares** están compuestas por linfocitos T, mayoritariamente LTh, células dendríticas maduras y macrófagos.

En la **Placa de Peyer** se encuentran los folículos, compuestos por LB secretores de IgM, precursores de células plasmáticas productoras de IgA y en los centros germinales de estos folículos se generan los LB de IgA memoria.

La **Lámina propia**, comprendida por debajo del epitelio, contiene células plasmáticas maduras productoras de IgA, LT (principalmente LTh), macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Estas poblaciones celulares se encuentran en estado continuo de migración, diferenciación y renovación.

Los **ganglios linfáticos mesentéricos** se localizan en el mesenterio del intestino; contiene LB, LT, células plasmáticas y células dendríticas.

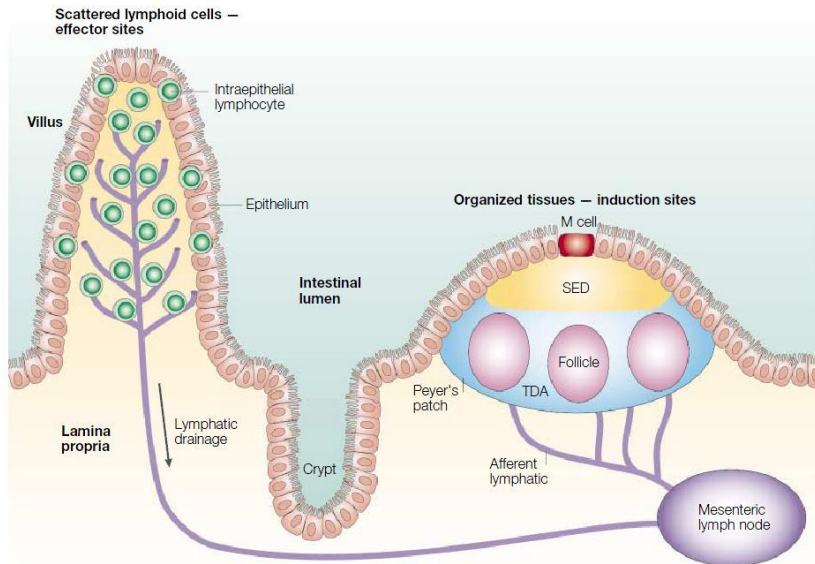


Figura 45. GALT organizado o inductor de la respuesta inmunitaria (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y GALT difuso o efector (linfocitos intraepiteliales o IEL y linfocitos de lámina propia o LPL) (Mowat 2003)

Los antígenos provenientes del lumen intestinal pueden penetrar en la mucosa intestinal y alcanzar el GALT a través de distintas vías:

- ♦ A través de las **células M** presentes en las placas de Peyer. Se transportan antígenos luminales como macromoléculas, partículas adhesivas, virus y bacterias, como también proteínas alimentarias e IgA. La membrana apical efectúa la captación y adhesión de los antígenos, luego se inicia el proceso de transcitosis por endocitosis o fagocitosis y se transportan por vesículas hacia la membrana basolateral, donde son liberados al espacio extracelular. La membrana basolateral de las células M presenta una bolsillo intraepitelial que alberga linfocitos y macrófagos, encargados de procesar los antígenos.

- ♦ Los **enterocitos** constituyen una segunda vía de entrada de los antígenos:

Por *mecanismo transcelular*, presentan menor accesibilidad que las células M debido a su recubrimiento externo de glicocáliz, rico en enzimas hidrolíticas, que impide la entrada de macromoléculas y microorganismos. Los enterocitos son capaces de captar los antígenos solubles que llegan a la superficie celular, procesarlos intracelularmente y presentarlos a los LT en moléculas MHC tipo I y II (Hershberg and Mayer 2000).

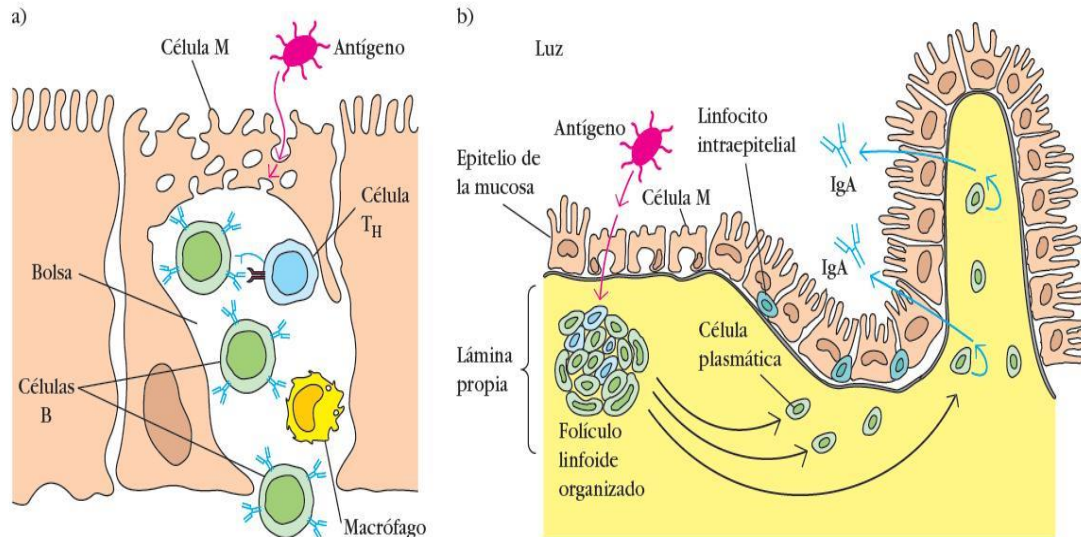
Por *mecanismo paracelular*, a través de los espacios entre enterocitos, generados por la expresión de proteínas asociadas a las uniones estrechas, donde las células dendríticas (CD) proyectan sus dendritas a través de ellas (Ramiro-Puig, Perez-Cano et al. 2008).

Las células M captan y transportan los antígenos lumenales hacia las placas de Peyer, donde las células presentadoras de antígenos (CPA) los interiorizan y los procesan hasta llegar a péptidos, para luego ser expresadas en la membrana plasmática asociadas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y ser reconocidas por los receptores de los LT (TcR). Las CPA activadas pueden interaccionar con LT de las áreas interfoliculares de la placa de Peyer o migrar hacia los ganglios linfáticos mesentéricos. Los LTh activados, se diferencian en **LTh1** y **LTh2**, cada subpoblación se amplifica a sí misma y ejerce un papel regulatorio sobre la otra (Sección 1.5).

Existe una tercera subpoblación efectora denominada **LTh17** caracterizada por la secreción de IL-17 e IL-6.

Además existen los **linfocitos T regulatorios (LTreg)**, que comprende a los linfocitos Tr1, Th3 y linfocitos CD4 CD25 Foxp3+ (Sección 1.8). Estos linfocitos son especialmente importantes en el intestino por su capacidad reguladora de la respuesta inmunitaria durante procesos inflamatorios e infecciosos. Desempeñan un papel clave en el desarrollo de la tolerancia oral frente antígenos inocuos procedentes de la dieta y de los microorganismos pertenecientes a la flora intestinal.

Ciertas citoquinas como IL-4, IL-5 y TGF- $\beta$  inducen la síntesis de **IgA** en linfocitos B de los folículos de las placas de Peyer. Estos linfocitos B, precursores de células plasmáticas, migran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos donde tiene lugar la maduración y expansión clonal. A continuación, estos linfocitos se dirigen a la circulación sistémica a través del conducto torácico. Después de varias recirculaciones, dichos linfocitos migran a los tejidos efectores, entre ellos la lámina propia intestinal, donde finalizan su maduración a células plasmáticas secretoras de IgA (*homing diferencial*) (Figura 46).



**Figura 46. Estructura de células M y producción de IgA en sitios inductores.** a) Las células M, localizadas en la mucosa, captan por endocitosis antígeno de la luz luminal. El antígeno se transporta a través de la célula y se elimina hacia la bolsa basolateral. b) El antígeno trasladado a través de la capa epitelial por células M a un sitio inductor, que activa células B y se diferencian en células plasmáticas productoras de IgA, para luego migrar a lo largo de las submucosas. La capa epitelial mucosa externa contiene linfocitos intraepiteliales, de los cuales muchos son LT (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Los LTh permanecen en la lámina propia y se distribuyen a lo largo de las vellosidades y criptas, mientras que los linfocitos T citotóxicos (LTc) migran preferentemente al epitelio, convirtiéndose así en IEL. Ambos tipos linfocitarios activados se mantienen en estado latente como células de memoria.

El GALT ejerce un papel defensivo y tolerogénico importante. Su particular estructura, diferenciada en tejido organizado (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y tejido difuso (IEL y LPL) permite el desarrollo de una respuesta eficaz y adecuada frente a patógenos invasivos e induce tolerancia oral en respuesta a antígenos inocuos procedentes de la dieta y del propio epitelio intestinal.

## 1.8 Tolerancia oral

La tolerancia se define como un estado de falta de respuesta inmunológica a un antígeno determinado. En circunstancias normales, el encuentro del sistema inmunitario con un antígeno lleva a una inmunorreacción, pero mediante diferentes mecanismos puede causar tolerancia o falta de respuesta del sistema. Los antígenos que inducen tolerancia se denominan **tolerógenos** en lugar de inmunógenos. Los mismos compuestos químicos

pueden ser tanto inmunógenos como tolerógenos, dependiendo del modo en que sean presentados al sistema inmunitario. Entre los factores que promueven la tolerancia en lugar de la estimulación del sistema inmunitario por un antígeno dado, se incluyen los siguientes:

- Dosis altas de antígeno
- Persistencia del antígeno en el hospedador
- Introducción por vía intravenosa u oral
- Ausencia de adyuvantes
- Bajas concentraciones de co-estimuladores

El antígeno introducido oralmente puede inducir un estado de **tolerancia oral**, mientras que el mismo antígeno administrado por vía intradérmica o subcutánea puede ser inmunógeno. Este mecanismo prevalece en la mucosa gastrointestinal y bronquial, y da origen tanto a la tolerancia local como sistémica. En intestino se denomina **homeostasis intestinal**, y permite que el sistema digestivo cumpla su función de intercambio de nutrientes en un medio (lumen) donde la carga antigénica es extremadamente alta, por lo que la inflamación sería una constante (inflamación crónica) si no existieran los mecanismos de tolerancia.

Los mecanismos utilizados para mantener la tolerancia oral incluyen:

- Anergia
- Delección (apoptosis)
- Inducción de linfocitos T regulatorios (LTreg).

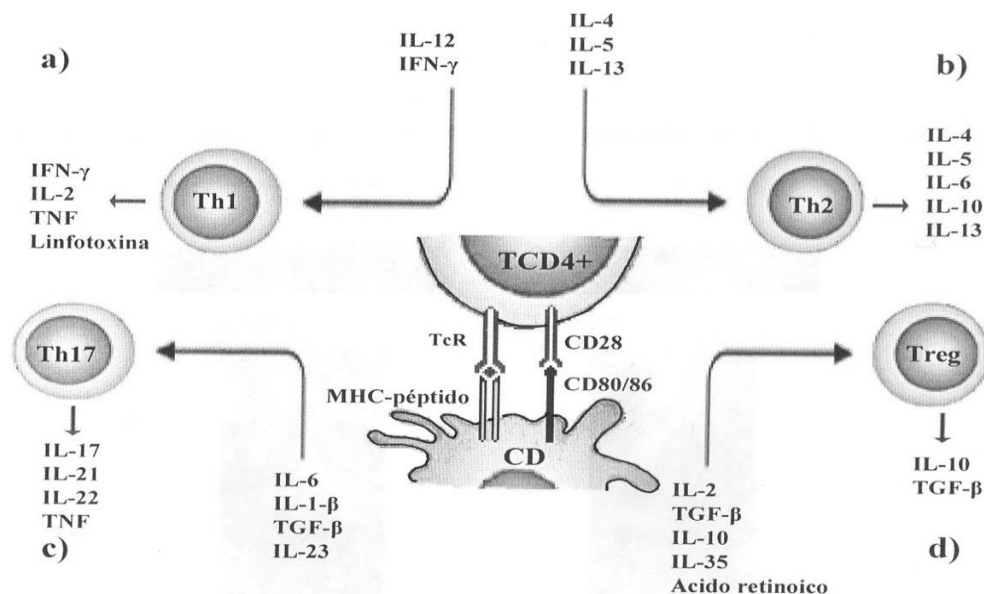
La **anergia** puede definirse como falta de respuesta a estímulos antigénicos. Dado un antígeno presentado por CPA a LT en ausencia de la señal-2 co-estimuladora B7/CD28, conduce a una forma de tolerancia conocida como anergia, que es un estado durable de incapacidad de respuesta del LT, inclusive si posteriormente recibe la señal-2 por las CPA.

**Delección (apoptosis):** la administración de una dosis elevada de antígeno por vía oral, induce la expresión del receptor Fas por los LT activados; con la subsecuente unión a FasL expresada en las CPA. Esta unión Fas/FasL conduce a la muerte celular (apoptosis) de los clones LT activados, específicos del antígeno administrado.



**Inducción de LT regulatorios:** Se han descrito 3 sub-poblaciones de LT regulatorios que se generan en la mucosa gastrointestinal, vinculadas a la falla en la tolerancia en pacientes que padecen alergias alimentarias: linfocitos Tr1, linfocitos Th3 y linfocitos T regulatorios  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ . Los *linfocitos Th3* (LT  $CD4^+$ ) secretan TGF- $\beta$  y cantidades variables de IL-4 e IL-10. Los *linfocitos Tr1* (LT  $CD4^+$ ) son secretores de IL-10. Los *linfocitos  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$*  poseen unida la citoquina TGF- $\beta$  a sus receptores de membrana. Este tipo celular expresa la proteína intracelular “factor de transcripción Foxp3”. En modelos murinos de asma o alergia alimentaria, la administración de antígenos por vía oral inducen la activación de los linfocitos  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ , los cuales previenen la secreción de IgE y la manifestaciones clínicas (Russo, Nahori et al. 2001, Tunis, Dawicki et al. 2012) (Figura 47).

Las citoquinas TGF- $\beta$  e IL-10 poseen efectos inmunosupresores y están involucradas en la inducción de tolerancia en las mucosas, debido principalmente a que amortiguan la respuesta celular de LTh1 y LTh2.



**Figura 47. Activación y diferenciación de linfocitos TCD4+.** La activación y diferenciación de linfocitos TCD4+ requiere: el reconocimiento por el TcR del complejo MHC/péptido presentado por la célula dendrítica (CD), señales accesorias de co-estimulación (como la interacción CD28-CD80/86) y la presencia de citoquinas que inducen la expansión clonal y diferenciación de los linfocitos. a) En presencia de IL-12 e IFN- $\gamma$ , se generan linfocitos Th1 que secretan IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF y linfotóxina. b) Las citoquinas IL-4, IL-5, e IL-13 inducen la diferenciación de la subpoblación Th2, que secreta IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. c) La presencia de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 y de TGF- $\beta$ , activa la diferenciación de linfocitos Th17, que secretan IL-17, IL-21 e IL-22. d) Finalmente, en presencia de TGF- $\beta$ , IL-2, IL-10, IL-35 y ácido retinoico, se induce la diferenciación de linfocitos T regulatorios, que secretan IL-10 y TGF- $\beta$  (Vergara 2009).

## 2. Generalidades

---

Debemos mencionar la diferencia que se establece en la inducción de la patología de la alergia alimentaria en los ratones con respecto a los humanos. En los ratones, al igual que lo que ocurre en individuos no alérgicos o no atópicos, la respuesta fisiológica frente a la exposición a un antígeno (Ag) inocuo que ingresa por el tracto gastrointestinal es la inducción de tolerancia inmunológica. Sólo en pacientes alérgicos o en ratones que se les administra el antígeno junto a un adyuvante, se desencadenan los mecanismos que median las reacciones alérgicas. Por lo tanto, para la generación de un modelo de alergia experimental en ratones, debemos recurrir a un procedimiento artificial de sensibilización.

El desarrollo del modelo murino de alergia alimentaria implica una fase inicial de sensibilización intragástrica, mediante el empleo de toxina colérica (TC) junto con las proteínas de leche de vaca (PLV); y una fase efectora a través de un desafío oral sólo con PLV donde se ponen en evidencia los mecanismos de Hipersensibilidad Tipo I, previamente instaurados. La inducción de signos clínicos a los pocos minutos (30-60 min) del desafío oral indica la instauración de un estado de hipersensibilidad. Se emplearan ratones de la cepa BALB/c que serán sensibilizados a través de un protocolo experimental previamente optimizado, mediante el empleo de TC y PLV. Sobre la base de este modelo de alergia alimentaria experimental IgE-mediada, proponemos su tratamiento mediante el empleo por vía ig del péptido P2 (SSEDIKE) proveniente de *Amaranthus hypochondriacus*, que ha probado tener un efecto anti-inflamatorio a través de la inhibición de la vía NF- $\kappa$ B (Capítulo II).

## 3. Objetivos

---

### 3.1 Objetivo general

Controlar y revertir los mecanismos inmunológicos locales y sistémicos Th2-dependientes en el modelo murino de alergia alimentaria IgE-mediada, mediante la administración por vía mucosal (ig) del péptido P2 (SSEDIKE) de *Amaranthus hypochondriacus* con probada capacidad anti-inflamatoria.

### 3.2 Objetivos específicos

- Estudiar los signos clínicos posteriores a la exposición al alérgeno y determinar la sensibilización de mastocitos por prueba cutánea.
- Determinar niveles séricos de los anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2a.
- Determinar de citoquinas Th1 y Th2-dependientes, como IL-3, IL5 e INF- $\gamma$ .
- Determinar la expresión génica de CCL20 en enterocitos.

## 4. Resultados

### 4.1 Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas *in vivo*

#### 4.1.1 Signos clínicos post-desafío oral (DO)

Se realizaron 2 desafíos orales, separados por 1 día, a los 10 y 12 días posteriores a la culminación del plan de inmunización. Se administró por vía ig únicamente PLV (20mg/dosis) para inducir los signos clínicos locales y/o sistémicos, y se semi-cuantificaron en base a la Tabla 2. En la Figura 48 se muestran los valores obtenidos en los diferentes grupos de animales.

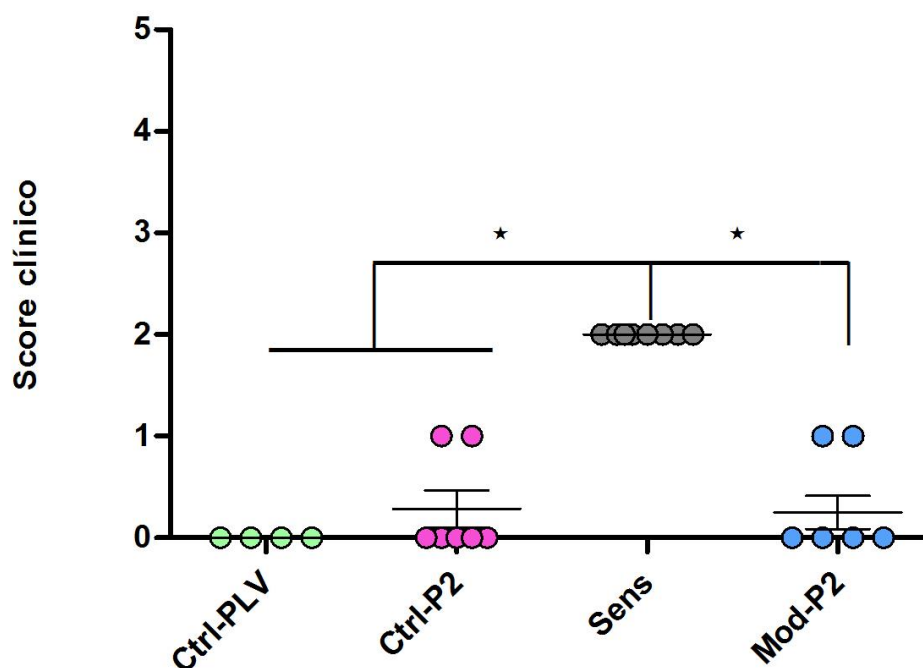


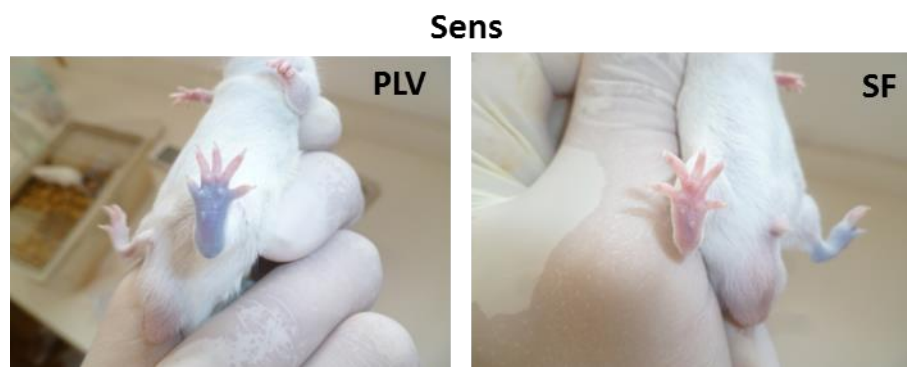
Figura 48. Cuantificación del puntaje o score clínico post-desafío oral. Se muestran los signos clínicos desarrollados a los 30 min del DO con 20 mg/dosis de PLV a los ratones de distintos grupos. Test Anova de una vía, seguido prueba Tukey's (\* $p < 0,05$ ) comparado con el grupo Sens. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SEM. Estos resultados corresponden a 2 experimentos representativos.

Como se observa en la Figura 48, los animales sensibilizados (Sens) mostraron un score uniforme de 2, mientras que los animales sensibilizados y tratados con P2 (Mod-P2) mostraron un score clínico significativamente menor ( $0,25 \pm 0,16$ ). Además puede observarse que los grupos controles Ctrl-P2 y Ctrl-PLV no desarrollan síntomas. Estos resultados indican que el péptido P2 atenúa la inducción de síntomas de hipersensibilidad en los animales sensibilizados.

#### 4.1.2 Prueba cutánea en almohadilla plantar (PC)

Para demostrar *in vivo* la supresión de la secreción de anticuerpos IgE específicos de PLV en ratones sensibilizados y tratados, se estudió la presencia de mastocitos sensibilizados en piel frente a la administración del antígeno PLV.

En la Figura 49, la administración sc de PLV en los grupos Ctrl-PLV y Ctrl-P2 arrojaron pruebas negativas, dado que no se observó coloración en la almohadilla plantar derecha trasera. En el grupo Sens se observó una coloración azul intensa en la almohadilla plantar trasera derecha a los pocos minutos de haberse administrado el antígeno PLV. En un caso se obtuvo coloración azul no sólo en la zona de inoculación, sino también en regiones alejadas como orejas, hocico, boca, patas, etc., lo cual sugiere la presencia de una reacción inflamatoria sistémica. En el grupo Mod-P2, se obtuvieron pruebas positivas en un 60 % de los casos (3 de 5) pero con un nivel de coloración intermedio.



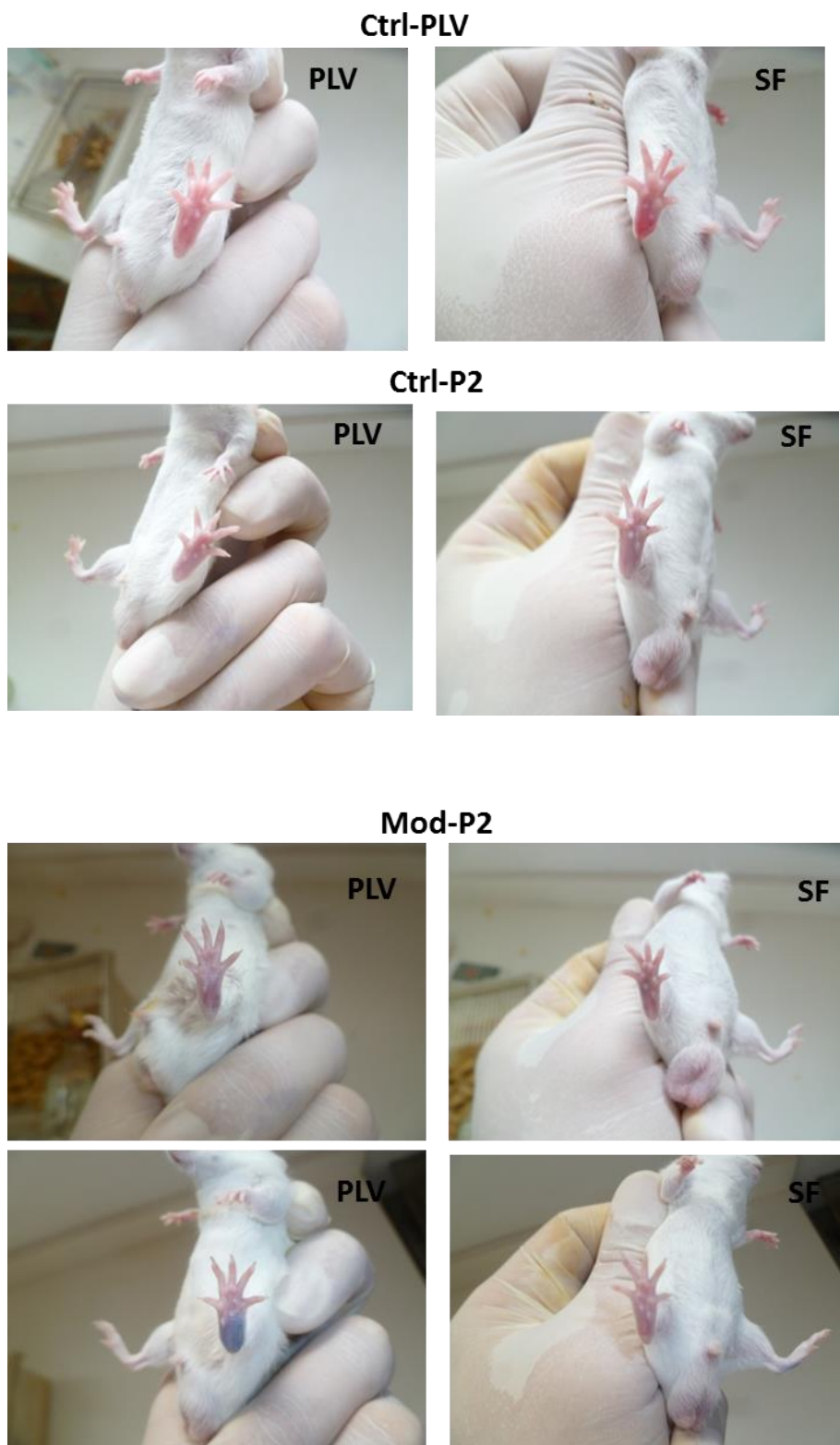


Figura 49. Prueba cutánea en almohadilla plantar izquierda y derecha. A los animales de los grupos Sens, Ctrl-P2, Ctrl-PLV y Mod-P2 se les inyectó por vía sc, PLV (plantar derecho) y SF (plantar izquierdo). El azul de Evans se inyectó por vía iv por la vena de la cola. La presencia de color azul en la piel en la zona de inoculación del antígeno a los 15-30 minutos se consideró una prueba cutánea

positiva. Estos resultados corresponden a un experimento representativo, se incluyen 2 fotos de un mismo animal para cada grupo, excepto para el caso Mod-P2 que se adjuntan las fotos de 2 ratones correspondientes a un caso positivo y otro negativo.

En base a la prueba cutánea, podemos concluir que el plan de modulación aplicado a los ratones sensibilizados (Mod-P2) indujo una disminución en la sensibilización de los mastocitos cutáneos.

En conjunto, las pruebas *in vivo* nos indican que la cantidad de células sensibilizadas con IgE se encuentran disminuidas en animales que fueron sensibilizados y tratados (Mod-P2) en comparación con los animales sensibilizados (Sens).

## 4.2 Evaluación de la respuesta inmune. Pruebas *in vitro*

### 4.2.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral

Para evaluar si el efecto modulador determinado *in vivo* se correlaciona con niveles disminuidos de secreción de anticuerpos, se evaluó la respuesta humoral a partir de la cuantificación de isotipos específicos de inmunoglobulinas en el suero de los animales, mediante el empleo de ensayos inmunoenzimáticos. Los niveles de IgE se determinaron por EAST, mientras que IgG1 e IgG2a por ELISA indirecto.

Se determinó IgE e IgG1 como isotipos asociados a una respuesta Th2-dependiente, e IgG2a como isotipo asociado a una respuesta Th1-dependiente. La relación entre IgG1 e IgG2a nos da información sobre el tipo de respuesta celular inducida como consecuencia de la sensibilización alérgica y del tratamiento con P2.

#### 4.2.1.1 Niveles séricos de IgE

Se obtuvieron niveles séricos de IgE específico a PLV significativamente mayores en los animales sensibilizados en comparación con los animales de los grupos control. En el grupo Mod-P2 se detectó una disminución significativa (\* $p < 0,05$ ) de un 45% en los niveles de IgE ( $1,009 \pm 0,345$  DO) en comparación con el grupo Sens ( $1,825 \pm 0,276$  DO).

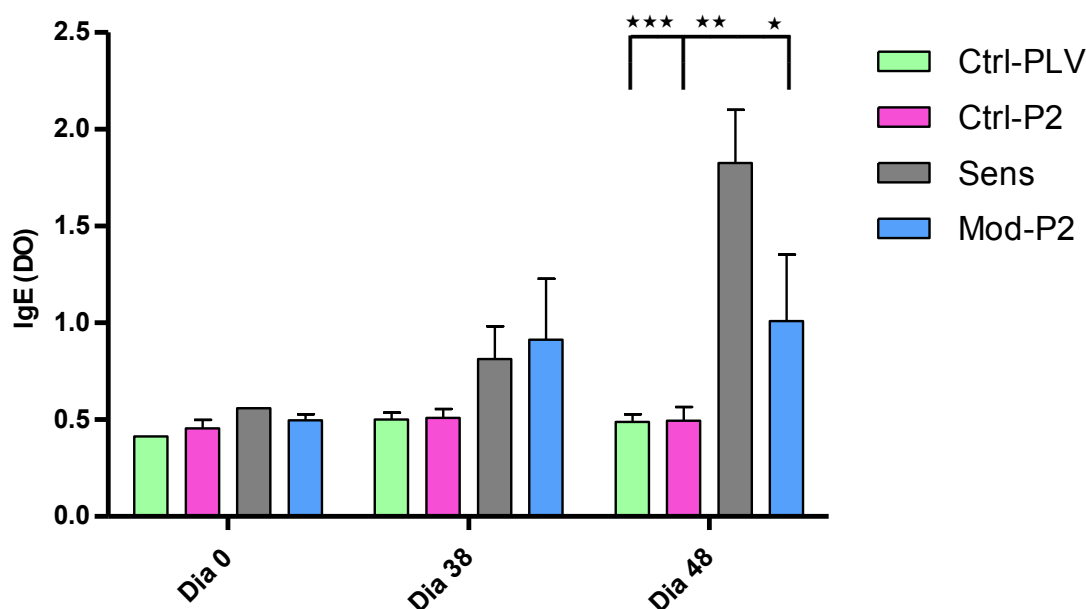


Figura 50. Cuantificación de los niveles séricos de IgE específico a PLV. Se empleó PLV para sensibilizar las fases sólidas. Test Anova de dos vía, seguido prueba Bonferroni (\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ) comparado con el grupo Sens. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SEM. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

Por lo tanto, los animales tratados con P2 (Mod-P2) indujeron modulación en la síntesis de los anticuerpos IgE específicos a PLV, resultado concordante con los obtenidos en las pruebas *in vivo*.

#### 4.2.1.2 Niveles séricos de IgG1e IgG2a

En la Figura 51 se muestran los valores correspondientes a IgG1 e IgG2a específicos para PLV.

En el grupo Sens se observó un aumento estadísticamente significativo del nivel de IgG1 específico con respecto a los controles (Ctrl-PLV y Ctrl-P2). En tanto, se logró una disminución significativa del nivel del isotipo IgG1 en el grupo Mod-P2 con respecto al grupo Sens. Esto demuestra una clara modulación en la sensibilización al antígeno PLV mediada por P2, logrando suprimir la síntesis y secreción del anticuerpo IgG1, asociado a la inmunidad Th2-mediada. Cabe aclarar que en el ratón, a diferencia de la especie humana, además de la IgE, la IgG1 puede participar en la desgranulación de los mastocitos



cutáneos inducida por el antígeno específico PLV, dado que estos expresan los receptores específicos en membrana.

Con respecto a IgG2a, indicador de inmunidad humoral Th1-dependiente, no evidenciamos variaciones en los niveles séricos. Por lo tanto ni la sensibilización, como era de esperar y ni la modulación, están mediadas por esta rama efectora de la inmunidad adaptativa.

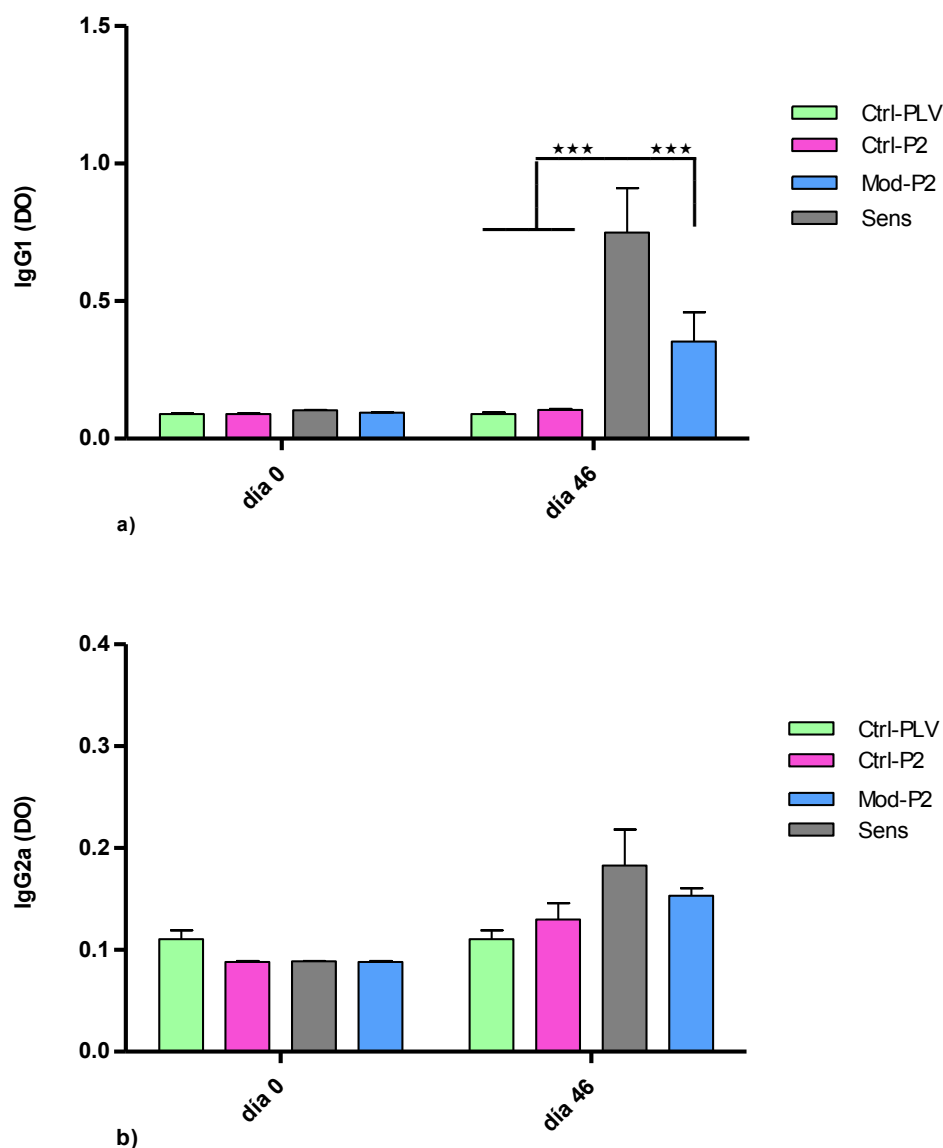


Figura 51. Cuantificación de los niveles séricos de IgG1 e IgG2a específicos para PLV. Valores promedios de DO  $\pm$  SEM para cada uno de los grupos, obtenidos a partir de los sueros de los ratones pertenecientes a los grupos Sens, Ctrl-P2, Ctrl-PLV y Mod-P2: (a) IgG1, e (b) IgG2a. Test Anova de dos vía, seguido prueba Bonferroni (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparado con el grupo Sens. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SEM. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

Por lo tanto, estos resultados indican claramente que el empleo de TC junto a PLV induce la sensibilización alérgica mediada por mecanismos Th2-dependientes y que la administración de P2 por vía ig en animales sensibilizados permite controlar la inducción de los mecanismos de Hipersensibilidad Tipo I. Además, estos resultados sugieren que el proceso inmunomodulatorio no implica la inducción de los mecanismos contra-regulatorios Th1-dependientes.

#### **4.2.2 Evaluación de la respuesta inmune celular**

Como parámetro para caracterizar la inflamación intestinal, primeramente se midió la expresión génica de la quimioquina CCL20 en células intestinales. Para correlacionar la respuesta inmune humoral con la respuesta inmune celular, se decidió evaluar parámetros asociados a la activación de los LT en bazo.

##### **4.2.2.1 Expresión de mRNA de CCL20 por enterocitos**

Se tomaron muestras de la primera porción intestinal en los ratones de los diferentes grupos, con el objetivo de evaluar la expresión de mRNA de la quimioquina CCL20 en enterocitos (Sección 12.2.1).

En la Figura 52 se observa el incremento en la expresión de mRNA de CCL20 en el grupo Sens, debido a la inflamación inducida por TC. Mientras que en el grupo Mod-P2 se obtuvo una disminución del 55% en la expresión relativa de mRNA CCL20 con respecto al grupo Sens.

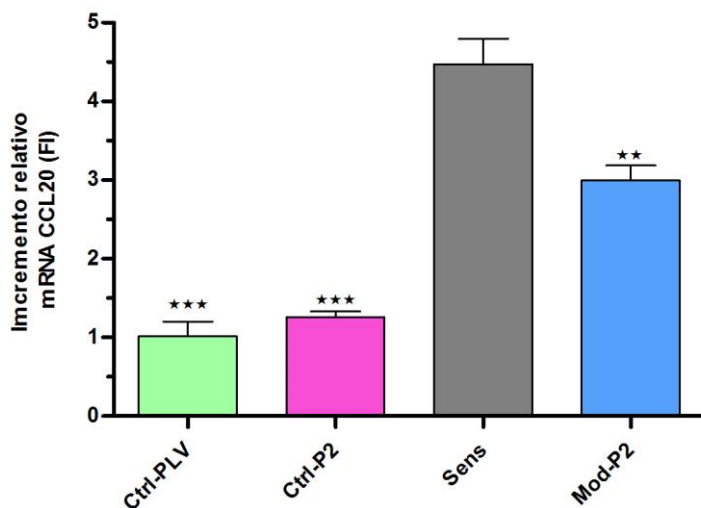


Figura 52. Incremento relativo de mRNA de CCL20 por qPCR, en la primera porción intestinal de ratón. Las cantidades de DNA se normalizaron a través de  $\beta$ -actina. Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  SEM. Test Anova de una vía, seguido prueba Dunnett's (\*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001) comparado con el grupo Sens. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

Dado que la quimioquina CCL20 es un potente mediador de la inmunidad innata, que atrae en etapas tempranas del proceso inflamatorio a células dendríticas inmaduras y linfocitos T hacia al foco inflamatorio, podemos concluir que el péptido P2 es un importante agente inmunomodulador en animales sensibilizados que son tratados por vía intragástrica. Este resultado es concordante al obtenido a partir del cultivo de enterocitos con FliC y P2, o con las diferentes muestras derivadas de la semilla de *Amaranthus hypochondriacus* (Cap. II).

#### 4.2.2.2 Secreción de citoquinas Th2 por esplenocitos

Con el objetivo de comprender mejor la modulación observada en la inmunidad humoral y en la sintomatología, se decidió estudiar el proceso de inmunidad celular. Par ello, se incubaron esplenocitos en presencia de PLV y se evaluó la concentración de citoquinas en el sobrenadante de cultivo.

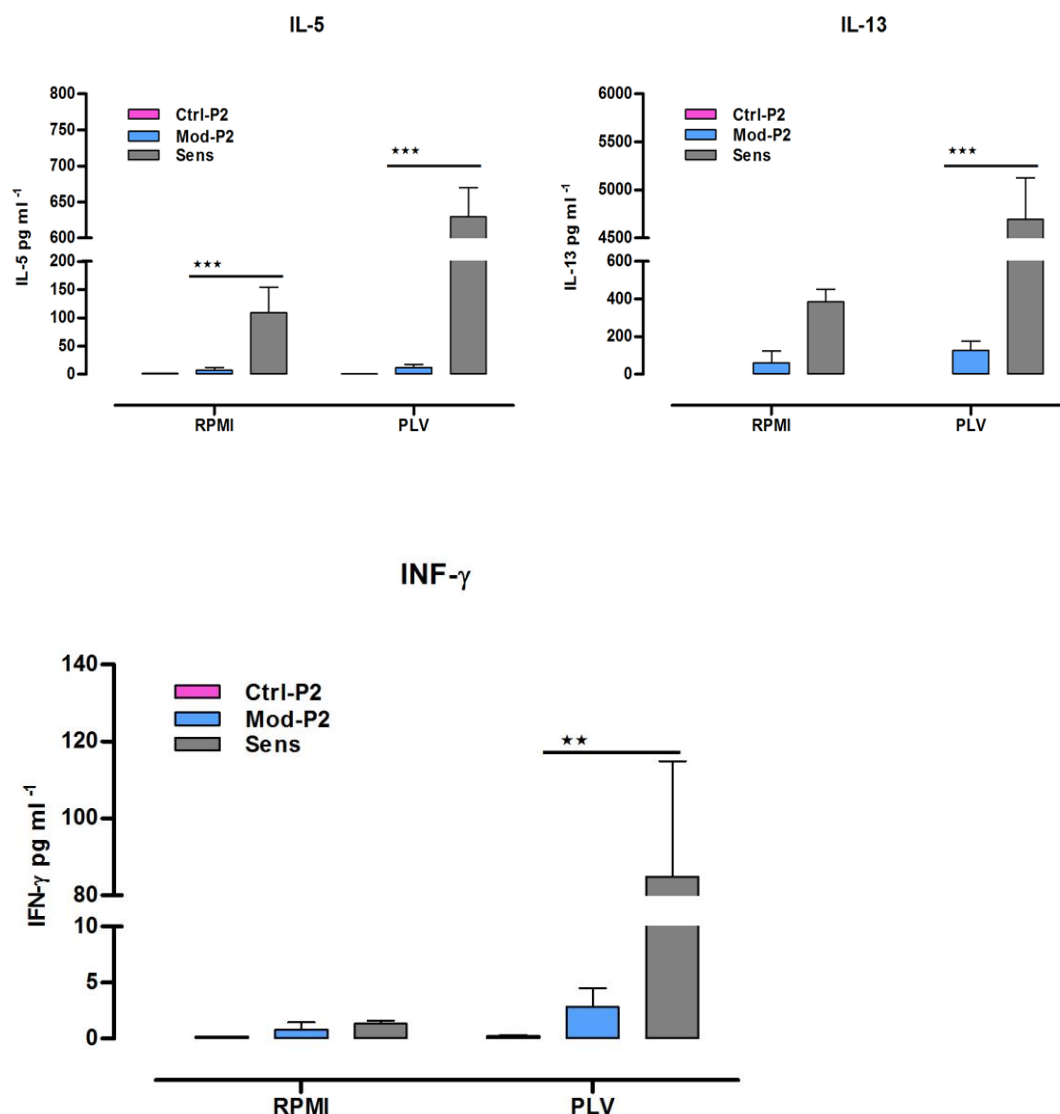


Figura 53. Cuantificación de citoquinas IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos de ratón de los grupos Ctrl-P2, Ctrl-PLV, Mod-P2 y Sens, mediante ELISA indirecto. Los resultados se expresan como la Media  $\pm$  SEM. Test Anova de dos vías, seguido prueba Bonferroni (\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ ) comparado con el grupo Sens. Estos resultados corresponden a 1 experimento representativo.

Como se observa en la Figura 53, cuando los esplenocitos provenientes de los ratones del grupo Sens se estimularon *in vitro* con PLV, se obtuvieron niveles significativamente aumentados de IL-5 e IL-13 y valores basales de IFN- $\gamma$ , debido a que este último no representa un valor elevado con significancia biológica. Lo que refleja en forma consistente que los animales sensibilizados con PLV junto a TC promueven una respuesta inmune celular Th2-dependiente.

Cuando las células pertenecientes a Mod-P2 se estimularon con PLV, los niveles de citoquinas Th2 (IL-5, IL-13) no difirieron estadísticamente con los niveles hallados en células no estimuladas (RPMI). Por lo tanto, estas citoquinas no se secretaron en esplenocitos estimulados con PLV, provenientes de ratones sensibilizados y tratados.

Podemos concluir que el tratamiento en simultáneo del péptido P2 con PLV, inhibe la síntesis de las citoquinas Th2-dependientes y además no induce una respuesta Th1-dependiente.

## 5. Conclusión

---

En base al modelo de alergia alimentaria experimental IgE-mediada, en este capítulo se realizó un tratamiento mediante el empleo por vía ig del péptido P2 (SSEDIKE) proveniente de *Amaranthus hypochondriacus*.

Se sabe que la TC estimula receptores en la membrana de los enterocitos, activando diferentes vías de señalización que involucran la vía canónica de NF- $\kappa$ B (Kim, Kim et al. 2013). Cuando se la administra junto a una proteína inocua, este proceso evita la instauración de la tolerancia oral específica del antígeno. El proceso inflamatorio desencadenado por TC induce la secreción temprana de CCL20, la cual atrae células dendríticas inmaduras que captan al antígeno (Baba, Imai et al. 1997). Migran al ganglio linfático regional e inducen la inmunidad adaptativa. Por lo tanto, los animales sensibilizados por vía intragástrica con TC mostraron en enterocitos una expresión génica de CCL20 elevada en comparación con ratones que no recibieron TC, mientras que los ratones tratados con P2 redujeron su expresión por inhibición de la activación de la vía NF- $\kappa$ B.

En este capítulo se demostró que la administración intragástrica de P2 evitó la instauración de un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal y la consiguiente sensibilización alérgica. La no instauración de los síntomas de hipersensibilidad post-desafío oral, la negativización de la prueba cutánea, los niveles reducidos de IgE sérica y la menor secreción de IL-5 e IL-13.

En conclusión, se demostró previamente que P2 presentó capacidad de inhibir la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B en células epiteliales intestinales, y que en el modelo de alergia experimental la vía NF- $\kappa$ B es inducida por administración intragástrica de TC. Por lo tanto la inhibición temprana de los mecanismos de inmunidad innata que median la respuesta adaptativa IgE-dependiente, permitió controlar las reacciones de hipersensibilidad que se inducen luego de la exposición de los ratones sensibilizados al alérgeno PLV.

*Estos resultados permiten afirmar que el péptido P2, proveniente de la semilla de Amaranthus hypochondriacus, inhibe la inmunidad innata y que esto conlleva a la modulación de la inmunidad adaptativa. Alentando a seguir profundizando en el estudio de los mecanismos moduladores implicados en el proceso inflamatorio.*



## ***Discusión y conclusiones finales***

---



En el presente trabajo de tesis se seleccionaron y caracterizaron muestras de *Amaranthus hypochondriacus* que contienen componentes peptídicos con capacidad inmunomodulatoria. Dado que la inducción de la inmunidad innata es crucial para definir el inicio de la respuesta inmune y para moldear el tipo de inmunidad adaptativa que se inducirá, se investigaron los efectos *in vitro* sobre las etapas tempranas de la inmunidad innata. Posteriormente, y una vez identificados los péptidos con acción inmunorregulatoria se estudió el poder anti-inflamatorio de los mismos en un modelo de alergia alimentaria IgE-dependiente a proteínas de leche de vaca.

En el **Capítulo I** de la tesis se describe la obtención de péptidos purificados de *Amaranthus hypochondriacus*. Se inicia con la muestra AI, que luego fue hidrolizada con alcalasa, dando lugar a las muestras AH23 y AH30. A partir de AH30 se obtuvieron, por separación de los componentes peptídicos por RP-HPLC, 80 fracciones (M1-M80). Del total, se eligieron dos fracciones, M1 y M2, para continuar con la separación, fraccionándose a su vez en 15 nuevas fracciones (F1-F15). Las fracciones F6, F9, F12, F13 y F14, provenientes de M2 se secuenciaron por UHPLC/ESI-MS, identificándose 16 péptidos: AVRNDDE, LENAIDK, LENAIDKK, SSEDIKE, SIDEDAGE, KEISDDEDEE, MADVQMAEAE, EALNDEE, EGGDEIKE, DDGADEIK, ISDDEDDEPK, ISDDEDDEPKKE, QDDGADEIK, GKVEDVDEE, IADEDPEANDK, IADEDPEANDKDK. Luego se aplicaron herramientas bioinformáticas sobre el total de los mismos, y se decidió por la síntesis de los péptidos P1 (LENAIDKK), P2 (SSEDIKE) y P3 (IADEDPEANDK).

En el **Capítulo II** de la tesis, se detalla la medición de la capacidad inhibitoria *in vitro* de las muestras peptídicas a través de los ensayos de modulación de la respuesta proinflamatoria activada por FliC. Se obtuvo un descenso de la quimioquina pro-inflamatoria CCL20, evidenciado por la disminución en la expresión de mRNA de CCL20, el descenso de la secreción de la quimioquina en el sobrenadante de cultivo en Caco-2 y la disminución de la actividad enzimática luciferasa en el sistema reportero Caco-2 ccl20:luc. De la gran variedad de muestras que se ensayaron, se demostró que el efecto modulador persiste a largo de sucesivas etapas de separación y purificación, obteniéndose en el caso de P2 un elevado poder inhibitorio. De los resultados obtenidos se puede concluir que P2 muestra un elevado efecto inmunomodulador sobre la inmunidad innata, específicamente sobre la inducción de la quimioquina pro-inflamatoria

temprana CCL20 en las células epiteliales activadas, la cual es capaz de atraer al foco inflamatorio en primera instancia células dendríticas y linfocitos T más tardíamente.

La modulación en la expresión de CCL20 es consecuencia de la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B. Se pudo demostrar el contacto del péptido con la superficie de las células epiteliales, dado que se determinó la disminución en la concentración de P2 en el sobrenadante apical de cultivo celular, pero sin poder determinar la traslocación al citosol celular. Hasta el momento desconocemos la naturaleza de la interacción célula-péptido P2 y los receptores de membrana que intervienen. Sin embargo, está comprobado que pequeñas secuencias, del orden de di y tri-péptidos, como por ejemplo KPV y VPY, presentan afinidad por el co-transportador de H<sup>+</sup>-oligopéptidos PepT1, el cual se expresa en forma constitutiva en los enterocitos y es el responsable de la absorción intestinal de los mismos. La expresión en el colon de este transportador se ve estimulada cuando se induce un cuadro inflamatorio como el que se presenta en las EII (Adibi 1997, Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008, Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012). Además, existe un grupo de receptores citosólicos en el epitelio intestinal, denominados NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) que participan en la inmunidad innata a través de la fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B kinasa, resultando en la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Estas proteínas son citosólicas, y dos miembros de esta familia, NOD1 y NOD2, reconocen productos derivados de peptidoglicanos bacterianos. NOD1 se une a tripéptidos producto de la degradación del peptidoglicano (L-Ala- $\gamma$ -D-glumeso-diaminopimelic acid, Tri-DAP) principalmente a partir de bacterias Gram-negativas, y NOD2 reconoce muramil dipéptidos (muramyldipeptide, MDP) derivados de la degradación del peptidoglicano de las paredes celulares bacterianas Gram-positivas y negativas. Curiosamente, los ligandos específicos para NOD1 y NOD2 también son sustratos de PepT1 (Dalmasso, Nguyen et al. 2011, Ingersoll, Ayyadurai et al. 2012, Moreira and Zamboni 2012). Este hecho induciría a pensar que al bloquear los receptores citosólicos NOD o disminuir su expresión, disminuiría la activación de la vía NF- $\kappa$ B, atenuando la incidencia de las enfermedades inflamatorias intestinales.

La caracterización *in vitro* de las propiedades supresoras del péptido P2 se complementó con ensayos *in vivo*, a través del estudio del efecto anti-inflamatorio empleando el modelo murino de alergia alimentaria IgE-mediada.

En el **Capítulo III** de la tesis, se utilizó del modelo murino de alergia alimentaria a PLV para el estudio del péptido P2 proveniente de *Amaranthus hypochondriacus* como agente

modulador de la respuesta inmune Th2-inducida, responsable de los signos clínicos de hipersensibilidad. En los animales tratados se indujo una disminución en los niveles séricos de IgE e IgG1 específicas (sin aumento de los valores IgG2a), disminución en la secreción de citoquinas Th2 como de IL-5 e IL-13 (manteniendo los niveles basales de IFN- $\gamma$ ) en cultivo de esplenocitos al ser estimulados con PLV, y descenso de la expresión de mRNA de CCL20 en mucosa intestinal. Además, la administración oral del péptido logró revertir las manifestaciones clínicas asociadas a mecanismos de hipersensibilidad desarrollados cuando los animales “alérgicos” fueron expuestos a PLV. Asimismo, las pruebas cutáneas fueron negativizadas lo cual indica una menor sensibilización de los mastocitos cutáneos.

Estos resultados demuestran que el poder inmunomodulatorio que ejerce P2 sobre la inmunidad innata y adaptativa, se ve reflejado en la disminución de la aparición de los signos clínicos asociados a mecanismos de hipersensibilidad. Por lo tanto, el péptido P2 modula *in vivo* e *in vitro* la inflamación intestinal inhibiendo la vía de NF- $\kappa$ B en enterocitos y en el modelo murino de alergia alimentaria.

La inmunomodulación mediante péptidos ha sido estudiada en modelos murinos de EII y en líneas celulares epiteliales *in vitro*. En el trabajo de Dalmasso y col. (Dalmasso, Charrier-Hisamuddin et al. 2008), se utilizó la secuencia peptídica KPV (P5), proveniente del extremo C-terminal de la hormona estimulante de  $\alpha$ -melanocitos ( $\alpha$ -MSH). El péptido P5 incubado en Caco-2, ejerció inhibición sobre la vía de señalización intracelular NF- $\kappa$ B (activada por la citoquina IL-1 $\beta$ ), medida a través del descenso en la degradación/aumento en la velocidad de recuperación del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  (inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha). Consecuentemente, P5 indujo la modulación de la quimioquina pro-inflamatorias IL-8, por disminución en la expresión de mRNA y secreción de la proteína en el sobrenadante de cultivo. Además, se determinó la competencia de KPV con el péptido Gly-Sar por el transportador PepT1, mediante marcación radiactiva de [ $^3$ H] de KPV. En el modelo de colitis inducida por administración oral de DSS, la co-administración de P5 redujo la inflamación histológica de colon, con descenso en los niveles de expresión de mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6 e IL-12, sin presentar variación en el nivel de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Además se observó el descenso de la actividad enzimática Mieloperoxidasa colónica, indicador de la extensión de la infiltración de neutrófilos.

Resultados similares fueron obtenidos por Kovacs-Nolan y col. (Kovacs-Nolan, Zhang et al. 2012), estos autores utilizaron el péptido VPY, proveniente de la hidrólisis enzimática de la Globulina-11S de soja. Cuando la línea celular Caco-2 activada por la citoquina TNF- $\alpha$ , fue incubada con VPY, se obtuvo una disminución en la secreción de la quimioquina IL-8 (importante factor atrayente de neutrófilos) al sobrenadante de cultivo. En forma complementaria, se midió el transporte transepitelial en monocapa de células Caco-2, y se obtuvo una disminución en el transporte hacia la cámara basolateral de VPY por adición del péptido competidor Gly-Sar. En el modelo murino de colitis inducida por administración oral de DSS, el tratamiento oral con VPY, redujo los síntomas clínicos y la pérdida de peso, con mejora en la histología de colon. Además, en tejido de colon se observó la disminución de la actividad de la enzima Mieloperoxidasa colónica y de la expresión mRNA de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-17, inclusive de la anti-inflamatoria IL-10. Cabe aclarar, que las dos citoquinas activadoras utilizadas (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) participan en numerosos escenarios fisiológicos y patológicos, que involucran la instauración de procesos inflamatorios, que de sostenerse en el tiempo generan patologías, semejante a las enfermedades inflamatorias gastrointestinales (Bouma and Strober 2003).

*En su conjunto los resultados de la presente tesis, demuestran que el péptido P2 posee la capacidad de modular la inmunidad innata y por consiguiente de inhibir la inducción de la inmunidad adaptativa, siendo factible de ser aplicado en los tratamientos de enfermedades inflamatorias intestinales. Si bien es necesario profundizar los estudios, P2 posee gran potencial de aplicación a mediano plazo en el diseño y desarrollo de nuevos alimentos funcionales.*



# ***Bibliografía***

---

- (E.C.), R. (2007). "No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods." Official Journal of the European Union: 3-18.
- Abugoch James, L. E. (2006). Relación estructura-funcionalidad de glutelinas y aislados proteicos de amaranto (Amaranthus hypocondriacus), Universidad Nacional de La Plata.
- Abugoch, L. E., N. E. Martínez and M. C. Añón (2010). "Influence of pH on structure and function of amaranth (Amaranthus hypochondriacus) protein isolates." Cereal Chemistry **87**(5): 448-453.
- Adibi, S. A. (1997). "The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function." Gastroenterology **113**(1): 332-340.
- Adibi, S. A. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease.
- Adler-Nissen, J. (1979). "Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid." Journal of Agricultural and Food Chemistry **27**(6): 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1981). "LIMITED ENZYMIC DEGRADATION OF PROTEINS: A NEW APPROACH IN THE INDUSTRIAL APPLICATION OF HYDROLASES." Eur Congr on Biotechnol, 2nd **32**(1): 138-156.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**(17): 3389-3402.
- Allen, W. F. (1931). "Accurate and adaptable micro-Kjeldahl method of nitrogen determination." Industrial and Engineering Chemistry **3**(3): 239-240.
- Anderle, P., M. Rumbo, F. Sierro, R. Mansourian, P. Michetti, M. A. Roberts and J. P. Kraehenbuhl (2005). "Novel markers of the human follicle-associated epithelium identified by genomic profiling and microdissection." Gastroenterology **129**(1): 321-327.
- Andrásófszky, E., Z. Szöcs, S. Fekete and K. Jelenits (1998). "Evaluation of the nutritional value of the amaranth plant I. Raw and heat-treated grain tested in experiments on growing rats." Acta Veterinaria Hungarica **46**(1): 47-59.
- Anjuere, F., C. Luci, M. Lebens, D. Rousseau, C. Hervouet, G. Milon, J. Holmgren, C. Ardavin and C. Czerkinsky (2004). "In vivo adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin." J Immunol **173**(8): 5103-5111.
- AOAC (1995). "Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed " AOAC International: Gaithersburg, MD.
- Avanza, M. V. and M. C. Añón (2007). "Effect of thermal treatment on the proteins of amaranth isolates." Journal of the Science of Food and Agriculture **87**(4): 616-623.

- Azuma, N., S.-i. Nagaune, Y. Ishino, H. Mori, S. Kaminogawa and K. Yamauchi (1989). "DNA-Synthesis Stimulating Peptides from Human  $\beta$ -Casein." Agricultural and Biological Chemistry **53**(10): 2631-2634.
- Bach, J.-F. (2005). "The Protective Effect of Infections on Immune Disorders." Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition **40**: S8.
- Bambou, J. C., A. Giraud, S. Menard, B. Begue, S. Rakotobe, M. Heyman, F. Taddei, N. Cerf-Bensussan and V. Gaboriau-Routhiau (2004). "In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal Escherichia coli strain." Journal of Biological Chemistry **279**(41): 42984-42992.
- Barba de la Rosa, A. P., I. S. Fomsgaard, B. Laursen, A. G. Mortensen, L. Olvera-Martínez, C. Silva-Sánchez, A. Mendoza-Herrera, J. González-Castañeda and A. De León-Rodríguez (2009). "Amaranth (Amaranthus hypochondriacus) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality." Journal of Cereal Science **49**(1): 117-121.
- Barrio, D. A. and M. C. Añón (2010). "Potential antitumor properties of a protein isolate obtained from the seeds of Amaranthus mantegazzianus." European Journal of Nutrition **49**(2): 73-82.
- Becker, R., E. L. Wheeler, K. Lorenz, A. E. Stafford, O. K. Grosjean, A. A. Betschart and R. M. Saunders (1981). "A Compositional Study of Amaranth Grain." Journal of Food Science **46**(4): 1175-1180.
- Benson, K., S. Cramer and H. J. Galla (2013). "Impedance-based cell monitoring: Barrier properties and beyond." Fluids and Barriers of the CNS **10**(1).
- Berridge, M. V., P. M. Herst and A. S. Tan (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. Biotechnology Annual Review. M. R. El-Gewely, Elsevier. **Volume 11**: 127-152.
- Bettenworth, D., M. Buyse, M. Bohm, R. Mennigen, I. Czorniak, K. Kannengiesser, T. Brzoska, T. A. Luger, T. Kucharzik, W. Domschke, C. Maaser and A. Lugering (2011). "The tripeptide KdPT protects from intestinal inflammation and maintains intestinal barrier function." Am J Pathol **179**(3): 1230-1242.
- Beyer, K., R. Castro, A. Birnbaum, K. Benkov, N. Pittman and H. A. Sampson (2002). "Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a TH2 cytokine profile." Journal of Allergy and Clinical Immunology **109**(4): 707-713.
- Blum, H., H. Beier and H. J. Gross (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." ELECTROPHORESIS **8**(2): 93-99.
- Bouma, G. and W. Strober (2003). "The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease." Nat Rev Immunol **3**(7): 521-533.
- Bressani, R. (1994). "Composition and nutritional properties of amaranth." Amaranth biology, chemistry and technology. Paredes LO, editor. México: Instituto Politécnico Nacional: 185-187.



- Cardamone, M. and N. K. Puri (1992). "Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins." Biochemical Journal **282**(2): 589-593.
- Caselato-Sousa, V. M. and J. Amaya-Farfán (2012). "State of Knowledge on Amaranth Grain: A Comprehensive Review." Journal of Food Science **77**(4): R93-R104.
- Castellani, O. (2000). Caracterización estructural y fisicoquímica de la globulina-P de amaranto, Universidad Nacional de La Plata, La Plata.
- Castellani, O. F., E. N. Martínez and M. C. Añón (2000). "Amaranth globulin structure modifications induced by enzymatic proteolysis." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**(11): 5624-5629.
- Ceska, M. (1981). "Radioimmunoassay of IgE using paper disks." Methods Enzymol **73**(Pt B): 646-656.
- Clément Nempont, D. C., Martin Rumbo, Coralie Bompard, Vincent Villeret and Jean-Claude Sirard (2008). "Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity." Journal of immunology **181**.
- Coste, M., V. Rochet, J. Léonil, D. Mollé, S. Bouhallab and D. Tomé (1992). "Identification of C-terminal peptides of bovine  $\beta$ -casein that enhance proliferation of rat lymphocytes." Immunology Letters **33**(1): 41-46.
- Charrier, L., A. Driss, Y. Yan, V. Nduati, J. M. Klapproth, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2006). "hPepT1 mediates bacterial tripeptide fMLP uptake in human monocytes." Laboratory Investigation **86**(5): 490-503.
- Chatterton, D. E. W., D. N. Nguyen, S. B. Bering and P. T. Sangild (2013). "Anti-inflammatory mechanisms of bioactive milk proteins in the intestine of newborns." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **45**(8): 1730-1747.
- Choksakulnimitr, S., S. Masuda, H. Tokuda, Y. Takakura and M. Hashida (1995). "In vitro cytotoxicity of macromolecules in different cell culture systems." Journal of Controlled Release **34**(3): 233-241.
- Dalmaso, G., L. Charrier-Hisamuddin, H. T. Thu Nguyen, Y. Yan, S. Sitaraman and D. Merlin (2008). "PepT1-Mediated Tripeptide KPV Uptake Reduces Intestinal Inflammation." Gastroenterology **134**(1): 166-178.
- Dalmaso, G., H. T. T. Nguyen, S. A. Ingersoll, S. Ayyadurai, H. Laroui, M. A. Charania, Y. Yan, S. V. Sitaraman and D. Merlin (2011). "The PepT1-NOD2 signaling pathway aggravates induced colitis in mice." Gastroenterology **141**(4): 1334-1345.
- De La Barba Rosa, A. P., J. Gueguen, O. Paredes-López and G. Viroben (1992). "Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(6): 931-936.
- Del Prete, G., E. Maggi, P. Parronchi, I. Chrétien, A. Tiri, D. Macchia, M. Ricci, J. Banchereau, J. De Vries and S. Romagnani (1988). "IL-4 is an essential factor for the IgE

synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants." The Journal of Immunology **140**(12): 4193-4198.

Delgado, M. O., M. Galleano, M. Añón and V. Tironi (2015). "Amaranth Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species." Plant Foods for Human Nutrition **70**(1): 27-34.

Eddy, S. R. (2004). "Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from?" Nat Biotech **22**(8): 1035-1036.

Feillet, H. and J. F. Bach (2004). "Increased incidence of inflammatory bowel disease: The price of the decline of infectious burden?" Current Opinion in Gastroenterology **20**(6): 560-564.

Filman, D. J., R. J. Brawn and W. B. Dandliker (1975). "Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage." Journal of Immunological Methods **6**(3): 189-207.

Fitzgerald, R. J. and H. Meisel (2003). Milk Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides. Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins. P. F. Fox and P. L. H. McSweeney, Springer US: 675-698.

Fogh, J. (1975). Human tumor cells in vitro, Plenum Press.

Fritz, M., B. Vecchi, G. Rinaldi and M. C. Añón (2011). "Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity." Food Chemistry **126**(3): 878-884.

Gagliardi, M. C. and M. T. De Magistris (2003). "Maturation of human dendritic cells induced by the adjuvant cholera toxin: role of cAMP on chemokine receptor expression." Vaccine **21**(9–10): 856-861.

Gell, P. G. H. and R. R. A. Coombs (1963). "Clinical aspects of immunology." Clinical aspects of immunology.

Gorinstein, S., R. Moshe, L. J. Greene and P. Arruda (1991). "Evaluation of four *Amaranthus* species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition." Journal of Agricultural and Food Chemistry **39**(5): 851-854.

Gorinstein, S., M. Zemser, M. Friedman, N. L. Vasco-Méndez and O. Paredes-López (1996). "Denaturant-Induced Conformations of Globulins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(1): 93-99.

Grammatikos, A. P. (2008). "The genetic and environmental basis of atopic diseases." Annals of Medicine **40**(7): 482-495.

Guzmán-Maldonado, S. and O. Paredes-López (1998). "Functional products of plants indigenous to Latin America: amaranth, quinoa, common beans, and botanicals." Functional foods. Biochemical and processing aspects: 293-328.

Hamburger, R. (1975). "Peptide inhibition of the Prausnitz-Kustner reaction." Science **189**(4200): 389-390.

- Hasler, C. M. (2002). "Functional foods: Benefits, concerns and challenges - A position paper from the American Council on Science and Health." Journal of Nutrition **132**(12): 3772-3781.
- Henikoff, S. and J. G. Henikoff (1992). "Amino acid substitution matrices from protein blocks." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10915-10919.
- Hershberg, R. M. and L. F. Mayer (2000). "Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells – polarity and complexity." Immunology Today **21**(3): 123-128.
- Hibi, M., S. Hachimura, S. Hashizume, T. Obata and S. Kaminogawa (2003). "Amaranth Grain Inhibits Antigen-Specific IgE Production Through Augmentation of the IFN-gamma Response in vivo and in vitro." Cytotechnology **43**(1-3): 33-40.
- Hidalgo, I. J., T. J. Raub and R. T. Borchardt (1989). "Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability." Gastroenterology **96**(3): 736-749.
- Higgins, D. G. and P. M. Sharp (1988). "CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer." Gene **73**(1): 237-244.
- Hiltz, M. E. and J. M. Lipton (1989). "Antiinflammatory activity of a COOH-terminal fragment of the neuropeptide  $\alpha$ -MSH." FASEB Journal **3**(11): 2282-2284.
- Hiriart, Y., A. Errea, D. G. Maciel, J. C. Lopez and M. Rumbo (2012). "A method for the purification of bacterial flagellin that allows simple upscaling." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(1): 15-21.
- Hjemel, L. M. and A. Chrambach (1981). "Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: A discussion of basic concepts." ELECTROPHORESIS **2**(1): 1-11.
- Ho, C. S., C. W. Lam, M. H. Chan, R. C. Cheung, L. K. Law, L. C. Lit, K. F. Ng, M. W. Suen and H. L. Tai (2003). "Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications." Clin Biochem Rev **24**(1): 3-12.
- Holmgren, J., I. Lönnroth, J. Månsson and L. Svennerholm (1975). "Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside of small intestine." Proceedings of the National Academy of Sciences **72**(7): 2520-2524.
- Hu, Q., R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R. Graham Cooks (2005). "The Orbitrap: a new mass spectrometer." J Mass Spectrom **40**(4): 430-443.
- Huerta-Ocampo, J. and A. Barba de la Rosa (2011). "Amaranth: A Pseudo-Cereal with Nutraceutical Properties." Current Nutrition & Food Science **7**(1): 1-9.
- Ibrahim, G. F., G. H. Fleet, M. J. Lyons and R. A. Walker (1985). "Method for the isolation of highly purified salmonella flagellins." Journal of Clinical Microbiology **22**(6): 1040-1044.
- Ingersoll, S. A., S. Ayyadurai, M. A. Charania, H. Laroui, Y. Yan and D. Merlin (2012). "The role and pathophysiological relevance of membrane transporter pept1 in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease." American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology **302**(5): G484-G492.

Innovation, N. R. C. U. S. A. C. o. T. I. (1984). Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop, National Academy Press.

Izadpanah, A., M. B. Dwinell, L. Eckmann, N. M. Varki and M. F. Kagnoff (2001). "Regulated MIP-3 $\alpha$ /CCL20 production by human intestinal epithelium: Mechanism for modulating mucosal immunity." American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology **280**(4 43-4): G710-G719.

Jenner, R. G. and R. A. Young (2005). "Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling." Nature Reviews Microbiology **3**(4): 281-294.

Jones, M. (2008). Understanding of the Molecular Mechanisms of Allergy. Allergy Methods and Protocols. M. Jones and P. Lympany, Humana Press. **138**: 1-15.

Kanto, S., H. Okino, S. I. Aizawa and S. Yamaguchi (1991). "Amino acids responsible for flagellar shape are distributed in terminal regions of flagellin." Journal of Molecular Biology **219**(3): 471-480.

Kanu, P. J., K. Zhu, J. Baby Kanu, H. Zhou, H. Qian and K. Zhu (2007). "Biologically active components and nutraceuticals in sesame and related products: a review and prospect." Trends in Food Science and Technology **18**(12): 599-608.

Kauzmann, W. (1959). Some Factors in the Interpretation of Protein Denaturation. **14**: 1-63.

Kay, A. (2001). "Allergy and allergic diseases: first of two parts." The New England journal of medicine **344**(1): 30-37.

Kelly, J. M., A. J. G. Moir, K. Carlson, Y. Yang, S. MacNeil and J. W. Haycock (2006). "Immobilized  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone 10-13 (GKPV) inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulated NF- $\kappa$ B activity." Peptides **27**(2): 431-437.

Kim, H. R., S. W. Park, H. J. Cho, K. A. Chae, J. M. Sung, J. S. Kim, C. P. Landowski, D. Sun, A. M. Abd El-Aty, G. L. Amidon and H. C. Shin (2007). "Comparative gene expression profiles of intestinal transporters in mice, rats and humans." Pharmacological Research **56**(3): 224-236.

Kim, K.-J., H.-A. Kim, K. H. Seo, H.-K. Lee, B. Y. Kang and S.-Y. Im (2013). "Cholera toxin breakdowns oral tolerance via activation of canonical NF- $\kappa$ B." Cellular Immunology **285**(1-2): 92-99.

Kindt, T., R. Goldsby and B. Osborne (2007). Kuby immunology. 6th, New York: WH Freeman. xxii.

Kindt, T. J., R. A. Goldsby, B. A. Osborne and J. Kuby (2007). Kuby immunology, Macmillan.

Klement, E., J. Lysy, M. Hoshen, M. Avitan, E. Goldin and E. Israeli (2008). "Childhood hygiene is associated with the risk for inflammatory bowel disease: A population-based study." American Journal of Gastroenterology **103**(7): 1775-1782.

- Konishi, Y., K. Horikawa, Y. Oku, J. Azumaya and N. Nakatani (1991). "Extraction of Two Albumin Fractions from Amaranth Grains: Comparison of Some Physicochemical Properties and the Putative Localization in the Grains." Agricultural and Biological Chemistry **55**(11): 2745-2750.
- Korhonen, H. and A. Pihlanto (2003). "Food-derived Bioactive Peptides - Opportunities for Designing Future Foods." Current Pharmaceutical Design **9**(16): 1297-1308.
- Korhonen, H. and A. Pihlanto (2006). "Bioactive peptides: Production and functionality." International Dairy Journal **16**(9): 945-960.
- Kovacs-Nolan, J., H. Zhang, M. Ibuki, T. Nakamori, K. Yoshiura, P. V. Turner, T. Matsui and Y. Mine (2012). "The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation." Biochim Biophys Acta **1820**(11): 1753-1763.
- Kovacs-Nolan, J., H. Zhang, M. Ibuki, T. Nakamori, K. Yoshiura, P. V. Turner, T. Matsui and Y. Mine (2012). "The PepT1-transportable soy tripeptide VPY reduces intestinal inflammation." Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects **1820**(11): 1753-1763.
- Kwon, J. H., S. Keates, S. Simeonidis, F. Grall, T. A. Libermann and A. C. Keates (2003). "ESE-1, an enterocyte-specific Ets transcription factor, regulates MIP-3 $\alpha$  gene expression in Caco-2 human colonic epithelial cells." Journal of Biological Chemistry **278**(2): 875-884.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lahov, E. and W. Regelson (1996). "Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: Casecidin, isracidin peptides." Food and Chemical Toxicology **34**(1): 131-145.
- Li-Weber, M. and P. H. Krammer (2003). "Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives." Nat Rev Immunol **3**(7): 534-543.
- Lodes, M. J., Y. Cong, C. O. Elson, R. Mohamath, C. J. Landers, S. R. Targan, M. Fort and R. M. Hershberg (2004). "Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease." J Clin Invest **113**(9): 1296-1306.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." The Journal of biological chemistry **193**(1): 265-275.
- Lycke, N. (2005). "From toxin to adjuvant: basic mechanisms for the control of mucosal IgA immunity and tolerance." Immunology Letters **97**(2): 193-198.
- Magnani, J. L., D. F. Smith and V. Ginsburg (1980). "Detection of gangliosides that bind cholera toxin: Direct binding of 125I-labeled toxin to thin-layer chromatograms." Analytical Biochemistry **109**(2): 399-402.
- Mahmoud, M. I. (1994). "Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products." Food Technology **48**(10): 89-95.

Marcone, M. F. (1999). "Evidence confirming the existence of a 7S globulin-like storage protein in *Amaranthus hypochondriacus* seed." Food Chemistry **65**(4): 533-542.

Martínez, E. N. and M. C. Añón (1996). "Composition and Structural Characterization of Amaranth Protein Isolates. An Electrophoretic and Calorimetric Study." Journal of Agricultural and Food Chemistry **44**(9): 2523-2530.

Martínez, E. N., O. F. Castellani and M. C. Añón (1997). "Common Molecular Features among Amaranth Storage Proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**(10): 3832-3839.

McGuirk, P., S. C. Higgins and K. H. G. Mills (2010). "The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma." Current Allergy and Asthma Reports **10**(1): 21-28.

Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature **427**(6970): 154-159.

Merlin, D., M. Si-Tahar, S. V. Sitaraman, K. Eastburn, I. Williams, X. Liu, M. A. Hediger and J. L. Madara (2001). "Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: Transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules." Gastroenterology **120**(7): 1666-1679.

Merrifield, R. B. (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide." Journal of the American Chemical Society **85**(14): 2149-2154.

Minkiewicz, P., J. Dziuba, A. Iwaniak, M. Dziuba and M. Darewicz (2008). "BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences." Journal of AOAC International **91**(4): 965-980.

Montie, T. C. and G. B. Stover (1983). "Isolation and characterization of flagellar preparations from *Pseudomonas* species." Journal of Clinical Microbiology **18**(3): 452-456.

Morafo, V., K. Srivastava, C. K. Huang, G. Kleiner, S. Y. Lee, H. A. Sampson and X. M. Li (2003). "Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice." Journal of Allergy and Clinical Immunology **111**(5): 1122-1128.

Moreira, L. O. and D. S. Zamboni (2012). "NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation." Frontiers in Immunology **3**: 328.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of Immunological Methods **65**(1-2): 55-63.

Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.

Mullis, K. B. (1990). "The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction." Scientific American **262**(4): 56-65.

Navolotskaya, E., Y. Kovalitskaya, V. Sadovnikov, Y. Zolotarev, A. Kolobov, V. Yurovsky and V. Lipkin (2008). "Synthetic ACTH-Like Peptide GKVLLKKRR, Corresponding to the



Fragment 81–88 of Human Pro-Interleukin-1 $\alpha$ , Acts as an Antagonist of ACTH Receptor." International Journal of Peptide Research and Therapeutics **14**(1): 10-15.

Nempont, C., D. Cayet, M. Rumbo, C. Bompard, V. Villeret and J. C. Sirard (2008). "Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity." J Immunol **181**(3): 2036-2043.

Nenci, A., C. Becker, A. Wullaert, R. Gareus, G. Van Loo, S. Danese, M. Huth, A. Nikolaev, C. Neufert, B. Madison, D. Gumucio, M. F. Neurath and M. Pasparakis (2007). "Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation." Nature **446**(7135): 557-561.

Neutra, M. R., A. Frey and J.-P. Kraehenbuhl (1996). "Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization." Cell **86**(3): 345-348.

Newberry, R. D. and R. G. Lorenz (2005). "Organizing a mucosal defense." Immunological Reviews **206**(1): 6-21.

Okada, H., C. Kuhn, H. Feillet and J. F. Bach (2010). "The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: An update." Clinical and Experimental Immunology **160**(1): 1-9.

Omkvist, D. H., S. B. Larsen, C. U. Nielsen, B. Steffansen, L. Olsen, F. S. Jørgensen and B. Brodin (2010). "A quantitative structure–activity relationship for translocation of tripeptides via the human proton-coupled peptide transporter, hPEPT1 (SLC15A1)." The AAPS journal **12**(3): 385-396.

Osborne, T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*, Longmans-Green

Pimenta, D. C. and I. Lebrun (2007). "Cryptides: Buried secrets in proteins." Peptides **28**(12): 2403-2410.

Pinto, M., S. Robine Leon and M. D. Appay (1983). "Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture." Biology of the Cell **47**(3): 323-330.

Quiroga, A. V. (2008). Globulina-P de amaranto: Análisis de estructura y homología con otras proteínas de reserva, Facultad de Ciencias Exactas.

Ramiro-Puig, E., F. Perez-Cano, C. Castellote, A. Franch and M. Castell (2008). "The bowel: a key component of the immune system." Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva **100**(1): 29-34.

Ramos, H. C., M. Rumbo and J. C. Sirard (2004). "Bacterial flagellins: Mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa." Trends in Microbiology **12**(11): 509-517.

Repetto, G., A. del Peso and J. L. Zurita (2008). "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity." Nature Protocols **3**(7): 1125-1131.

Rice, P., I. Longden and A. Bleasby (2000). "EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite." Trends in Genetics **16**(6): 276-277.

Romagnani, S. (1991). "Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more." Immunology Today **12**(8): 256-257.

Romagnani, S. (1994). "Lymphokine production by human T cells in disease states." Annual review of immunology **12**(1): 227-257.

Rouessac, F. and A. Rouessac (2013). Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques, Wiley.

Rubio-Aliaga, I. and H. Daniel (2008). "Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition." Xenobiotica **38**(7-8): 1022-1042.

Russo, M., M.-A. Nahori, J. Lefort, E. Gomes, A. de Castro Keller, D. Rodriguez, O. G. Ribeiro, S. Adriouch, V. Gallois, A. M. C. de Faria and B. B. Vargaftig (2001). "Suppression of Asthma-like Responses in Different Mouse Strains by Oral Tolerance." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **24**(5): 518-526.

Sabbione, A. C., A. Scilingo and M. C. Añón (2015). "Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates." LWT - Food Science and Technology **60**(1): 171-177.

Savu, A., J. Potter, S. Li and Y. Yasui (2008). "Breast cancer and microbial cancer incidence in female populations around the world: A surprising hyperbolic association." International Journal of Cancer **123**(5): 1094-1099.

Scilingo, A. A., S. E. Molina Ortiz, E. N. Martínez and M. C. Aón (2002). "Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments. Relationship between structure and solubility." Food Research International **35**(9): 855-862.

Schägger, H. (2006). "Tricine-SDS-PAGE." Nature Protocols **1**(1): 16-22.

Schagger, H. and G. Von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Analytical Biochemistry **166**(2): 368-379.

Segura-Nieto, M., N. Vázquez-Sánchez, H. Rubio-Velazquez, L. E. Olguín-Martínez, C. E. Rodríguez-Nester and L. Herrera-Estrella (1992). "Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(9): 1553-1558.

Segura Nieto, M., N. Vazquez Sanchez, H. Rubio Velazquez, L. E. Olguin Martinez, C. E. Rodriguez Nester and L. Herrera Estrella (1992). "Characterization of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(9): 1553-1558.

Segura Nieto, M., N. Vázquez Sánchez, H. Rubio Velazquez, L. E. Olguín Martínez, C. E. Rodríguez Nester and L. Herrera Estrella (1992). "Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) seed proteins." Journal of Agricultural and Food Chemistry **40**(9): 1553-1558.

Shimizu, M. (2004). "Food-derived peptides and intestinal functions." Biofactors **21**(1-4): 43-48.



- Shimizu, M. (2010). "Interaction between food substances and the intestinal epithelium." Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **74**(2): 232-241.
- Shirakawa, T., T. Enomoto, S. I. Shimazu and J. M. Hopkin (1997). "The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder." Science **275**(5296): 77-79.
- Siemion, I. Z., A. Kluczyk and Z. Wieczorek (1998). "Anti-IL-1 Activity of Peptide Fragments of IL-1 Family Proteins." Peptides **19**(2): 373-382.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J.-P. Kraehenbuhl and J.-C. Sirard (2001). "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(24): 13722-13727.
- Sierro, F., B. Dubois, A. Coste, D. Kaiserlian, J. P. Kraehenbuhl and J. C. Sirard (2001). "Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(24): 13722-13727.
- Sloan, A. E. (1999). "The New Market: Foods for the Not-So-Healthy." Food Technology **53**(2): 54-60.
- Smaldini, P., R. Curciarello, A. Candreva, M. A. Rey, C. A. Fossati, S. Petruccelli and G. H. Docena (2012). "In vivo evidence of cross-reactivity between cow's milk and soybean proteins in a mouse model of food allergy." Int Arch Allergy Immunol **158**(4): 335-346.
- Smaldini, P. L., A. E. Ibañez, C. A. Fossati, J. Cassataro and G. H. Docena (2014). "Oral delivery of Brucella spp. recombinant protein U-Omp16 abrogates the IgE-mediated milk allergy." Human Vaccines and Immunotherapeutics **10**(7): 2015-2023.
- Steel, A., S. Nussberger, M. Romero, W. Boron, C. Boyd and M. Hediger (1997). "Stoichiometry and pH dependence of the rabbit proton-dependent oligopeptide transporter PepT1." The Journal of physiology **498**(Pt 3): 563-569.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." Bmj **299**(6710): 1259-1260.
- Tabacco, A., F. Meattini, E. Moda and P. Tarli (1979). "Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination." Clinical Chemistry **25**(2): 336-337.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." International Immunology **17**(1): 1-14.
- Tironi, V. A. and M. C. Añón (2010). "Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis." Food Research International **43**(1): 315-322.
- Tsuji, K. and S. J. Harrison (1979). "Limulus amebocyte lysate - a means to monitor inactivation of lipopolysaccharide." Progress in clinical and biological research **29**: 367-378.
- Tunis, M. C., W. Dawicki, K. R. Carson, J. Wang and J. S. Marshall (2012). "Mast cells and IgE activation do not alter the development of oral tolerance in a murine model." Journal of Allergy and Clinical Immunology **130**(3): 705-715.e701.

Urrego Álvarez, J. R., L. d. C. Hernández Bonfante and J. Marrugo Cano (2009). "Factores epidemiológicos en la inmunopatogénesis de la alergia a los alimentos." Revista Salud Uninorte **25**: 258-279.

Vandezande, L. M., B. Wallaert, P. Desreumaux, A. Tsicopoulos, C. Lamblin, A. B. Tonnel and A. Janin (1999). "Interleukin-5 immunoreactivity and mRNA expression in gut mucosa from patients with food allergy." Clinical & Experimental Allergy **29**(5): 695-702.

Vecchi, B. (2007). "Actividad anti-hipertensiva de péptidos derivados de proteínas de amaranto." Universidad Nacional de La Plata, La Plata.

Vecchi, B. and M. C. Añón (2009). "ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin." Phytochemistry **70**(7): 864-870.

Vergara, U. (2009). "Linfocitos T reguladores y respuesta inmune." Avances en Ciencias Veterinarias **24**(1-2).

Vijay-Kumar, M. and A. T. Gewirtz (2009). "Flagellin: Key target of mucosal innate immunity." Mucosal Immunology **2**(3): 197-205.

Walker, C., J. C. Virchow, P. L. Bruijnzeel and K. Blaser (1991). "T cell subsets and their soluble products regulate eosinophilia in allergic and nonallergic asthma." The Journal of Immunology **146**(6): 1829-1835.

Wang, W. and E. G. De Mejia (2005). "A New Frontier in Soy Bioactive Peptides that May Prevent Age-related Chronic Diseases." Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **4**(4): 63-78.

Weinstock, J. V. and D. E. Elliott (2009). "Helminths and the IBD hygiene hypothesis." Inflammatory Bowel Diseases **15**(1): 128-133.

Wieczorek, Z., A. Kluczyk, J. J. Słóń-Usakiewicz and I. Z. Siemion (1997). "A hexapeptide VTIFYF from C-terminal part of interleukin-1 receptor antagonist, an inhibitor of IL-1 - IL-1 receptor interaction." Polish Journal of Pharmacology **49**(2-3): 107-117.

Williams, K. L. (2013). Endotoxins: pyrogens, LAL testing and depyrogenation, CRC Press.

Winckler, J. (1974). "Vital staining of lysosomes and other cell organelles of the rat with neutral red." Progress in histochemistry and cytochemistry **6**(3): 1-91.

